

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Efecto de Bionanocompositos de Quitosano/Lisozima sobre la
Producción de Glucanasas y Estructuras Subcelulares de



Aspergillus parasiticus

TODO · LO · ILUMINAN

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

Francisco Julián Rodríguez Córdova

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

DEDICATORIAS

Quiero tanto dedicarles este trabajo como agradecerles a mis padres Pancho y Chava por brindarme tanto amor, cuidar de mí y haberme guiado y formado durante el transcurso de mi vida, a la vez que motivarme para así poder superarme a mí mismo y crecer como persona.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Maribel Plascencia por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis, y haberme dado apoyo y consejos desde que comencé trabajar con ella en el servicio, hasta la fecha.

A los miembros del jurado por tomarse el tiempo de apoyarme con el trabajo y por los comentarios hechos al respecto que me ayudaron a desarrollarme como un mejor estudiante: Dra. Carina Robles, al Dr. Victor Ocaño y al Dr. Aldo Arvizu.

A mi Universidad de Sonora y al DIPA por abrirme las puertas para poder crecer como un mejor estudiante.

A mi familia Lolis, Cheke, Geli, Richi, Ticho, Paco, Josué y Jacibe por ser una de mis más grandes motivaciones en esta vida y haberme obsequiado tanto cariño y amor a pesar del bullying intenso (sin este no traería chiste).

A mis primos y amigos de toda la vida Isi, Gil, Martin, Jesús, Pedro, Alejandro (Geli), Bojo, Alba y a mi manada, por la cual me siento totalmente afortunado de haberme topado en su camino, ya que con ustedes he vivido de los mejores momentos de mi vida y sé que seguirá siendo así.

A mis mayokonesos Héctor, Yoko, Andrea y Rafa por haberme hecho reír tanto y aguantado durante la realización de los trabajos en la Uni. Vamos por churros!

A Brisa por haberme brindado su apoyo y cariño durante la carrera y a Machuy y Lupita de igual manera por haber estado ahí dándome una gran amistad.

A Carlos y a Yessica por haber crecido junto conmigo en el aspecto más laboral y haber sufrido de igual manera en la Uni (aunque nos hayas abandonado Yessica, no cierto).

A mis amiguitos Regina, Emmy, Pacman, Jaz y Rigo de igual manera por comprender mi locura en este mundo.

A mis amiguitas de la prepa Mirsa, Marce, Raquel y Esme, que a pesar de que ya no nos vemos tan seguido, sé que siguen ahí para apoyarme.

A Aarón por haberme apoyado y no dejarme tirar la toalla durante mi investigación, al igual que todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología del DIPA.

A todos ustedes, gracias de todo corazón...

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
REVISIÓN DE LITERATURA	13
Quitosano: Generalidades y Fuentes de Obtención.....	13
Propiedades Físicoquímicas	16
Peso Molecular	16
Solubilidad	16
Viscosidad	16
Grado de Desacetilación	17
Aplicaciones.....	17
Propiedades Antimicrobianas.....	18
Bionanocompositos de Quitosano	19
Generalidades.....	19
Métodos de Obtención.....	19
Nanoprecipitación.....	20
Emulsión por goteo	20
Reticulación (Cross-linking).....	20
Secado por pulverización (Spray drying).....	21
Gelificación iónica (Ionic Gelation)	21
Propiedades Físicoquímicas	21
Propiedades Antimicrobianas.....	22
Aplicaciones.....	23
Bionanocompositos de Quitosano/lisozima	25
Lisozima.....	25
Aspergillus spp	26
Generalidades.....	26
<i>Aspergillus parasiticus</i>	28
Importancia	29
Estructura celular	29

Glicoproteínas	29
Quitina.....	30
METODOLOGÍA	31
Reactivación de Cepas	31
Cultivo Monospórico.....	31
Preparación de la Suspensión de Esporas	32
Preparación de la Solución de Quitosano	32
Preparación de las Nanopartículas de Quitosano-Lisozima	33
Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	33
Obtención de Extractos Poliméricos Fúngicos	33
Hidrólisis de β -1,3-glucano.....	34
Ensayos Microbiológicos	34
Preparación de Cultivos en Microplaca	34
Germinación de Esporas.....	35
Análisis Morfométrico	35
Viabilidad Celular.....	35
Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores	36
Tinción con Yoduro de Propidio.....	36
Tinción con Blanco de Calcoflúor	36
Tinción con Faloidina.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Efecto de los bionanocompositos sobre la actividad hidrolítica.....	38
Viabilidad de esporas mediante tinción con azul de tripán.....	41
Análisis morfométrico	42
Germinación de Esporas	43
Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores	44
Ioduro de propidio (IP)	44
Blanco de Calcoflúor (BC)	45
Faloidina.....	47
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Contenido de quitina en diferentes organismos	14
2. Aplicaciones del quitosano en la industria.	17
3. Desarrollo y aplicaciones de compositos de quitosano con compuestos bioactivos.	23
4. Especies del genero <i>Aspergillus spp</i>	28
5. Métodos de control de hongos en alimentos.....	30
6. Producción de azúcares reductores de glucosa.....	39
7. Producción de azúcares reductores utilizando PDB para evaluar la capacidad hidrolítica.	40
8. Producción de azúcares reductores utilizando caldo Czapek para evaluar la capacidad hidrolítica.	40
9. Efecto de los bionanocompositos de quitosano y quitosano-lisozima sobre la morfometría de <i>Aspergillus parasiticus</i>	43
10. Efecto de los bionanocompositos de quitosano y quitosano-lisozima sobre la germinación de las esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
1. Estructura química de la quitina	13
2. Estructura química del quitosano	15
3. Liberación del protoplasto debido a una lisis en la membrana citoplasmática.	25
4. Morfología de <i>Aspergillus spp</i>	27
5. Curva estándar de glucosa utilizada para la cuantificación de azúcares reductores	39
6. Micelio de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrollado en medio control (A), observado a las 24 horas de incubación a 28°C, a 40x., observadas a las 24 horas de incubación a 28 °C, a 40x.....	41
7. Esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> inoculadas en medio adicionado con nanopartículas de quitosano (B), observadas a las 24 horas de incubación a 28°C, a 40x. Esporas de <i>A. parasiticus</i> inoculadas en medio con nanopartículas del biocomposito quitosano/lisozima (C), observadas a las 24 horas de incubación a 28°C, a 40x.....	42
8. Esporas e hifas de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrolladas en medio control, a las 24 horas, teñidas con solución de yoduro de propidio, a 40x. Campo claro (A) y campo con fluorescencia (B)	44
9. Esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrolladas en medio adicionado con nanopartículas de quitosano (C) y nanopartículas del composito quitosano/lisozima (D), a las 24 horas, teñidas con solución de yoduro de propidio, a 40x	45
10. Micelio y esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> teñidas con solución de Blanco de Calcoflúor, observadas a las 24 horas de incubación en medio de cultivo control (A), medio adicionado con nanopartículas de quitosano (B) y medio con nanopartículas del composito quitosano/lisozima (C), a 40x.....	46
11. Esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> teñidas con solución de faloidina, observadas a las 24 horas de incubación en medio de cultivo adicionado con nanopartículas de quitosano (A) y medio con nanopartículas del composito quitosano/lisozima (B), a 40x.....	48

RESUMEN

Una de las problemáticas que sufre la industria alimentaria es la pérdida de alimentos, en ocasiones por la proliferación de agentes patógenos como los hongos. Entre las especies de hongos que mayor afectan a los cultivos se encuentra el género *Aspergillus*, los cuales ocasionan un daño grave al ambiente y a la salud. En esta investigación se trabajó con el hongo *Aspergillus parasiticus*, cuya importancia se debe a que es productor de aflatoxinas, además de ser uno de los principales hongos que causan infección durante la conservación de los alimentos y afectan gravemente los productos postcosecha como el maíz y el trigo. Se han buscado distintas alternativas para poder controlar el crecimiento de este patógeno, entre los cuales se tiene el uso del quitosano debido a su efecto fungicida. En este trabajo se buscó potenciar su efecto mediante la elaboración de nanopartículas de quitosano cargadas con lisozima, evaluando su efecto sobre el crecimiento, morfología, organelos subcelulares y actividad enzimática de *A. parasiticus*. Se determinó el efecto sobre la viabilidad de las esporas con el colorante azul de tripán y se encontró que los tratamientos presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo, afectando la producción de β -1,3-glucanos o bien, la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa, componente principal de la pared celular y enzima que lleva a cabo la síntesis del β -1,3-glucano, respectivamente. De igual forma, se observaron daños en la integridad de la membrana de las esporas mediante tinción con yoduro de propidio, Blanco de Calcoflúor y faloidina. Asimismo, se encontró un fuerte efecto en la germinación de las esporas al encontrar cero por ciento de germinación en los tratamientos con los bionanocompositos. Con base a los resultados obtenidos se concluye que las nanopartículas de quitosano cargadas con lisozima afectan el crecimiento *in vitro* de *A. parasiticus*, por lo que constituyen una alternativa viable para el control del hongo en la industria alimentaria.

INTRODUCCIÓN

Después de la celulosa, la quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, cuya tasa de reposición en la biósfera (10^{9-11} toneladas anuales) duplica a la de la celulosa, siendo así un importante recurso renovable (Hernández et al., 2009). Químicamente, la quitina es un homo polímero formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosas (GlcNAc, N-acetil glucosamina) unidas por enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) (Valenzuela, 2012).

El quitosano es el principal derivado N-desacetilado de la quitina, que se obtiene mediante una reacción de desacetilación, es decir, la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2, lo cual da lugar a un grupo amino en esa posición. Cuando la desacetilación del material inicial es incompleta se obtiene una mezcla de cadenas que contienen residuos de unidades GlcNAc y 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosas (GlcN) unidos por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) (Valenzuela, 2012).

La presencia de grupos amino en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles en cuanto a la producción de nanocompositos se refiere, esto debido a la posibilidad de obtener una amplia variedad de materiales y soportes con diversas aplicaciones tales como anclaje de enzimas, matrices de liberación controlada de fármacos, obtención de películas y sistemas nanoparticulados, etc. Estas propiedades hacen del quitosano un material con gran potencial para su implementación en campos como la biotecnología, biomedicina, agricultura, entre otras (Lárez, 2003).

Se ha reportado que el quitosano posee propiedades fungicidas y bactericidas, incluso induce mecanismos de defensa en tejidos vegetales (López et al., 2013). Además, este biopolímero también ha sido utilizado en la curación de heridas y como un agente antioxidante (Sayari et al., 2016).

Con respecto a la actividad antimicrobiana, se han propuesto diferentes mecanismos de acción del quitosano. El principal se basa en un efecto en la permeabilidad de la membrana citoplasmática mediante la interacción de sus grupos amino ($-\text{NH}_2$) con componentes fosfolipídicos cargados negativamente en las membranas de los microorganismos, alterando así el intercambio del medio intracelular con el medio extracelular. Hay mecanismos que involucran la formación de quelatos con algunos metales de transición vitales para la célula (zinc, cobre, hierro) y la inhibición de algunas enzimas (Ayala et al., 2014). Otro factor capaz de alterar la sensibilidad del hongo al quitosano son las interacciones electrostáticas del quitosano añadido (exógeno), cargado positivamente, las cuales se ven menos favorecidas al interactuar con paredes celulares que poseen quitosano endógeno (Lárez, 2003).

El quitosano puede ser utilizado para producir películas, hidrogeles, andamios porosos, además de micro y nanopartículas (Goycoolea et al., 2012). Diversos son los métodos que se han desarrollado para la síntesis y obtención de materiales a micro y nano-escala, mismos que han sido implementados en diversos campos de investigación donde han contribuido al desarrollo de nuevos conocimientos, entre ellos el campo de la química verde (Mohanpuria, 2007).

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo “bottom-up” como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento, en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente (Goycoolea et al., 2012).

Por otro lado, la lisozima es una molécula alcalina con actividad antimicrobiana, que cataliza la hidrólisis de los enlaces β -1-4 entre el ácido N-acetilmurámico y los residuos de N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano, así como también entre los residuos de N-acetil-d en ciclodextrinas. De manera natural la lisozima se encuentra en vesículas celulares conocidas como lisosomas, donde se sabe puede degradar la pared celular de hongos y bacterias; en adición, es un agente conservador seguro en los alimentos (Liu et al., 2013).

Recientemente se han realizado estudios sobre el desarrollo de bionanocompositos de quitosanos cargados con lisozima mediante la técnica de gelación ionotrópica, en donde se han obtenido nanopartículas con tamaños que van de los 50 a 280 nm de diámetro y se ha demostrado que mantienen de manera eficaz la actividad antibacterial de la enzima (lisozima), la cual se libera lentamente por tres semanas *in vitro*, siendo activa contra *Staphylococcus epidermidis* hasta por cinco días de incubación (Hernández, 2016).

En base a lo anterior, la implementación de la nanotecnología para la síntesis y obtención de biomateriales nanoparticulados elaborados a base de polímeros naturales como el quitosano y la lisozima, representan una promesa en el campo de la ciencia de los alimentos, donde podría ayudar al aumento en la producción y calidad microbiológica de los alimentos a nivel mundial, además de reducir los residuos, logrando así ser más sustentable.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener bionanocompositos de quitosano-lisozima y determinar la actividad antifúngica sobre el crecimiento *in vitro* del hongo *Aspergillus parasiticus*.

Objetivos Específicos

Obtener bionanocompositos de quitosano-lisozima mediante la técnica de nanoprecipitación.

Evaluar la capacidad hidrolítica de los bionanocompositos de quitosano-lisozima sobre el polisacárido β -1,3-glucano de la pared celular de *Aspergillus parasiticus*.

Determinar el efecto de los bionanocompositos sobre la morfometría y la germinación de esporas del hongo.

Analizar el efecto de los bionanocompositos sobre organelos subcelulares de *Aspergillus parasiticus*, mediante microscopía de fluorescencia.

Tabla 1. Contenido de quitina en diferentes organismos.

Fuente	Quitina (%)	Referencia
Crustáceos		
Cangrejo (cáncer)	72.1c	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo (<i>Carcinus</i>)	64.2b	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo rey (<i>Paralithodes</i>)	35.0b	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo azul (<i>Callinectes</i>)	14.0a	Tharanathan y Kittur, 2003
Cangrejo (<i>Syllacerrata</i>)	23.0b	Oudor-Odote et al., 2005
Camarón (<i>Crangon</i>)	69.1c	Tharanathan y Kittur, 2003
Camarón de Alaska	28.0d	Tharanathan y Kittur, 2003
Camarón (<i>Penaeus spp</i>)	13.1-23.2b	Cira et al., 2002
Langosta(<i>Nephrops</i>)	69.8	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta (<i>Homarus</i>)	60-75c	Tharanathan y Kittur, 2003
Langosta (<i>Panilirus ornatus</i>)	15.71b	Oudor-Odote et al., 2005
Gamba	67.9-97.0c	Beaney et al., 2005
Gamba (<i>Penaeus monodon</i>)	22.18b	Chandumpai et al., 2004
Gamba (<i>Penaeus indicus</i>)	28.0 b	Oudor-Odote et al., 2005
Moluscos		
Concha deproteinizada de Krill	40.2	Tharanathan y Kittur, 2003
Concha de Ostra (<i>Ostreaedulis</i>)	3.6	Tharanathan y Kittur, 2003
Concha de almeja	6.1	Tharanathan y Kittur, 2003
Pluma de calamar	41.0	Tharanathan y Kittur, 2003
Pluma de calamar (<i>L. lessoniana</i>)	36.06b	Chandumpai et al., 2004
Pluma de calamar (<i>L. formosana</i>)	36.55b	Chandumpai et al., 2004
Insectos		
Cucaracha (<i>Periplaneta americana</i>)	2.0d	Tharanathan y Kittur, 2003
Escarabajo (<i>Coleoptera</i>)	18.4c	Tharanathan y Kittur, 2003
Escarabajo (<i>Coleoptera</i>)	27-35c	Tharanathan y Kittur, 2003
Mosca (<i>Diptera</i>)	54.8c	Tharanathan y Kittur, 2003
Mariposa sulfurada común (<i>Colias philodice</i>)	64.0c	Tharanathan y Kittur, 2003
Mosca azul larva (<i>Calliphora erythrocephala</i>)	12.0b	Oudor-Odote et al., 2005
Gusano de cera (<i>Galleria melonella</i>)	33.7c	Tharanathan y Kittur, 2003
Hongos		
<i>Aspergillus niger</i>	42.0e	Tharanathan y Kittur, 2003

	24.01f	Wu et al., 2005
<i>Penicillium notatum</i>	18.5e	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20.1e	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Agaricus bisporus</i> (Champiñón)	27b	Wu et al., 2005
<i>Saccharomyces cereviseae</i>	2.9e	Tharanathan y Kittur, 2003
<i>Mucor rouxii</i>	44.5	Tharanathan y Kittur, 2003
	13.25f	Wu et al., 2005
<i>Lactarius vellereus</i> (champiñón)	19.0	Tharanathan y Kittur, 2003
a Peso cuerpo húmedo	d Peso total cutícula húmeda	
b Peso cuerpo seco	ePeso seco de pared celular	
c Peso cutícula orgánica	f Peso micelio seco	

Fuente: Trujillo (2015).

La reacción de desacetilación, es decir, la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2, da lugar a un grupo amino en esa posición y cuando la desacetilación del material de partida es incompleta, se obtiene una mezcla de cadenas que contienen residuos de unidades GlcNAc y 2-amino-2-desoxi- β -Dglucopiranososa (GlcN) unidas por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) (Figura 2). La relación de esas cadenas depende de las condiciones de reacción ya que genera quitosanos con distintas propiedades estructurales, físicas, químicas y funcionales (Valenzuela et al., 2012). El quitosano se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable (Marmol et al., 2011).

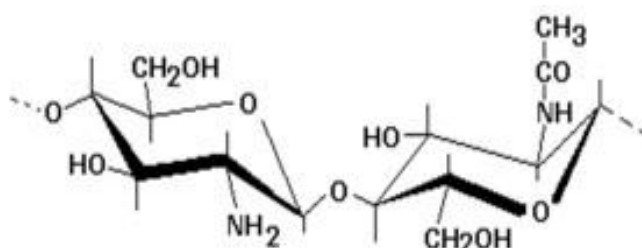


Figura 2. Estructura química del quitosano.

Fuente: Marmol et al., 2011.

Propiedades Físicoquímicas del Quitosano

Los polímeros naturales como la quitina y el quitosano cuentan con diferentes propiedades físicoquímicas como son el peso molecular, la solubilidad, la viscosidad y el grado de desacetilación, que determinan, en muchas ocasiones, su aplicación (Pillai et al., 2009; Pacheco, 2010).

Peso Molecular

El peso molecular es una de las propiedades más características de la quitina, ya que esta propiedad la vuelve insoluble en solventes acuosos como el agua, álcalis diluidos y concentrados, alcohol y en ciertos disolventes orgánicos, lo que puede interferir para su desarrollo y procesamiento (Nieto y Orellana, 2011).

Existen diversos métodos para su determinación, como son la dispersión de la luz, la cromatografía de permeabilidad en gel y la viscometría, siendo este último el más utilizado por ser un método sencillo y rápido, además de no ser costoso (Agüelles et al., 2004; Tsaih y Chen, 1999). Cabe mencionar que el peso molecular puede afectar al quitosano como espesante, regulador de la viscosidad, antifúngico, agente ligante de color, grasa y agua, entre otras aplicaciones (Argüelles et al., 2004).

Solubilidad

La solubilidad depende del grado de desacetilación y degradación del polímero. Estos factores determinan con qué tipo de sustancias o soluciones se podrá asociar. El quitosano no se solubiliza a pH superior a 6 y funciona solamente en sistemas ácidos, siendo una propiedad relevante para su aplicación en alimentos (Hernández, 2004). En general, el quitosano es insoluble en agua pura y en solventes orgánicos (Park et al., 2002).

El grado de solubilidad también se puede ver afectado por otros factores como el tipo de solvente, la temperatura, el pH, el pKa y la fuerza iónica del ácido donde se disuelva, así como la concentración iónica (Argüelles et al., 2004; Rinaudo, 2006).

Viscosidad

La viscosidad, al igual que la solubilidad, depende del grado de desacetilación, además de la temperatura, pH, fuerza iónica y el solvente ácido utilizado. Es por ello que el quitosano exhibe una amplia gama de viscosidades en los medios ácidos diluidos, que dependen principalmente de su peso molecular (Nieto y Orellana, 2011).

Para determinar el valor de viscosidad intrínseca del quitosano a menudo se hace uso del método de viscometría, el cual también se utiliza para determinar el peso molecular promedio del mismo mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. De esta forma se relaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular (Argüelles et al., 2004).

Grado de Desacetilación

Durante la desacetilación química de la quitina se emplean soluciones concentradas de NaOH o KOH a temperaturas superiores a 100 °C. Las condiciones específicas que se den durante la reacción dependerán de diversos factores, tales como el material de partida, el tratamiento previo y el grado de desacetilación deseado (Peniche, 2006).

Existen varios métodos para determinar el grado de desacetilación del quitosano, entre ellos se encuentra la titulación potenciométrica, espectroscopía de infrarrojo cercano y UV, resonancia magnética nuclear, la prueba ninhidrina, entre otros (Khan et al., 2002; Wu y Zivanovic, 2008; Zhang et al., 2005). Los resultados obtenidos en cualquiera de estos métodos puede variar dependiendo de la preparación de la muestra o de las condiciones experimentales (Lavertu et al., 2003).

Aplicaciones del Quitosano

El quitosano tiene aplicaciones en diversos campos (Tabla 2), esto debido a sus propiedades fisicoquímicas, mismas que influyen en sus características funcionales y biológicas, como por ejemplo la acción antimicrobiana (Pastor e Higuera, 2004).

Tabla 2. Aplicaciones del quitosano en la industria.

Industria	Aplicación
Biomedicina	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad inmunológica y antitumoral • Curación (vendas)
Tratamiento de aguas	<ul style="list-style-type: none"> • Remoción de iones metálicos y residuos orgánicos • Reducción de olores
Separaciones cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Separación de enzimas • Cromatografía de gases y columna
Papelera y textil	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia al quebrado de papel • Resistencia al deterioro microbiano o enzimático
Cosmética	<ul style="list-style-type: none"> • Cuidado dental

	<ul style="list-style-type: none"> • Lentes de contacto
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Activador de mecanismos de defensa en plantas • Estimulación de crecimiento en plantas • Liberación de agroquímicos y nutrientes en suelo • Protección de semillas contra congelamiento • Mejora germinación de semillas • Protege de daño microbiano

El uso del quitosano en actividades agrícolas es reciente, sin embargo, puede considerarse hoy en día abundante y en aumento (Larez, 2008). Uno de sus principales usos en la actualidad es aplicar su actividad antimicrobiana sobre diversos campos en la agricultura.

Propiedades Antimicrobianas del quitosano

Uno de los usos más importantes del quitosano es como agente antimicrobiano. Esto se debe a los mecanismos de acción por los cuales el quitosano (con distintos grados de acetilación) inhibe el desarrollo de diversas especies de microorganismos, aunque aún no han sido dilucidados completamente; sin embargo, hay algunos mecanismos propuestos para explicar dichas acciones específicas:

La interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente con las membranas celulares cargadas negativamente de algunas bacterias (Gram negativas como *Escherichia coli*). Esto se debe a que, debido a la formación del complejo polielectrolito, se bloquea físicamente la membrana externa de la pared celular del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrientes/desechos, ocasionando su muerte (Chung et al., 2004).

La propuesta más aceptada hasta la actualidad es que la actividad antimicrobiana se da por una interacción electrostática entre los grupos NH_3^+ del polication y los grupos fosforilos (Fernández et al., 2003) de los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas, lo que causa daños en ésta, provocando la salida de material intracelular (Liu et al., 2004).

Para en el caso de las bacterias Gram positivas (como *S. aureus*), se ha determinado que el efecto antimicrobiano es aún más eficaz. Se ha propuesto que se debe a que su membrana celular permite un mejor flujo del quitosano hacia el interior, ya que poseen poros más grandes en la membrana celular externa (Li et al., 2007). Cabe mencionar que también

se ha observado un efecto inhibitorio con ayuda del quitosano inclusive en el crecimiento de algunos hongos como *Neurospora crassa* (Aranda et al., 2015). Recientemente, el estudio del quitosano en forma de materiales nanoestructurados con propiedades funcionales es un tema de gran relevancia e interés debido al alcance asociado a las potenciales aplicaciones en diversas áreas.

Bionanocompositos de Quitosano

Generalidades

Las nanopartículas poliméricas se definen como partículas de tamaño inferior a 1 μm (Brigger et al., 2002), generalmente entre 10 y 500 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza. Según su método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando, en caso que lo posea, influenciarán su funcionalidad y efectividad (Gómez, 2014).

Las micropartículas y las nanopartículas son de los estudios más prometedores en lo que se refiere a los sistemas de transporte que muestran potencial para la liberación de medicamentos por la mucosa. En primer lugar, dichos tratamientos se describieron para aplicaciones farmacéuticas, en la que las nanoestructuras pueden ser capaces de proteger la degradación enzimática (Rieux et al., 2006), ya que se ha observado una mejor eficacia y reducción de la toxicidad del fármaco (Rampino et al., 2013).

Una aplicación prometedora es en el control de las enfermedades de productos agrícolas, siendo este un problema creciente que no ha sido resuelto del todo a pesar de tener una amplia variedad de compuestos químicos (Bautista et al., 2006). Además, el uso excesivo de los fungicidas ha tenido un efecto adverso sobre el medio ambiente y la salud humana y animal, así como también ha provocado resistencia en ciertos patógenos. Esto ha causado un aumento considerable en la demanda de productos frescos libres de contaminantes químicos (productos orgánicos) o mínimamente procesados, con una tendencia actual en todo el mundo de explorar métodos alternativos para el control de dichas enfermedades ocasionadas durante la cosecha y post-cosecha de los cultivos (Yang et al., 2009).

Métodos de Obtención

Los sistemas nanoparticulados varían en su estructura y morfología. Estas pueden ser en partículas, en forma de fibras, cápsulas, capas, o micelas, todas ellas en una escala nanométrica. La forma final y funcionalidad depende del método de elaboración. En este

sentido, varios métodos han sido desarrollados para la preparación y la obtención de micro y nanopartículas. La nanoprecipitación, nanoemulsión por goteo, reticulación, secado por pulverización, la gelificación iónica y la nanoprecipitación, son algunos de los métodos más comúnmente utilizados (Hernández et al., 2016).

Nanoprecipitación. En este proceso, el polímero o el fármaco se disuelven en un disolvente polar miscible en agua, como acetona, etanol o metanol. Esta solución se adiciona sobre un no-solvente bajo agitación magnética, entendiéndose por no solvente como aquel disolvente que es miscible con el disolvente del polímero y en el cual el polímero es insoluble (Mundargi et al., 2008). A medida que se adiciona el no-solvente se provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita. Generalmente, el no solvente está constituido por una solución acuosa que contiene un agente estabilizante. Las nanopartículas se forman instantáneamente por una rápida difusión del disolvente al medio acuoso, que se elimina posteriormente de la suspensión someténdola a presión reducida (Zhao et al., 2008). El tamaño de las partículas y el rendimiento de fabricación se ven afectados por la concentración del polímero. Generalmente se usan concentraciones entre 1 y 10 % (p/v) de polímero. Este comportamiento se atribuye al incremento en la viscosidad de la fase orgánica (Rocha et al., 2009).

Emulsión por goteo. En este método se utilizan tanto los principios de la emulsión, como los de la reticulación y la precipitación. Sin embargo, en lugar de gotas reticuladas estables, se utiliza la precipitación de forma inducida lo que permite la coalescencia de gotas de quitosano con gotas de hidróxido de sodio (NaOH). En aceite de parafina líquida se produce una emulsión estable que contiene una solución acuosa de quitosano junto con un compuesto activo y luego, de la misma manera, se produce otra emulsión estable que contiene una solución acuosa de NaOH. Cuando ambas emulsiones se mezclan a una agitación de alta velocidad, las gotas de cada emulsión pueden chocar al azar y combinarse, precipitando pequeñas gotas de quitosano para dar como producto las partículas de pequeño tamaño (Yao et al., 2012).

Reticulación (Cross-linking). Este método implica la reticulación de los grupos amino del quitosano con los grupos aldehído del agente de reticulación. La emulsión se prepara y se estabiliza con un tensoactivo. Entonces la emulsión estabilizada es una mezcla con un agente de reticulación tal como glutaraldehído para formar esferas. Posteriormente, dichas esferas se filtran y después se lavan con hexano o alcohol y se dejan secar. En este método, el tamaño de la partícula se controla por el tamaño de gota de la emulsión que interactúa con el medio de reticulación y la velocidad de agitación (Bodnar et al., 2006).

Secado por pulverización (Spray drying). El secado por pulverización es una técnica conocida para producir polvos, gránulos, o aglomerados de soluciones mixtas de algunos fármacos y suspensiones. Este método se basa en el secado de las gotas atomizadas en una corriente de aire caliente. Durante su proceso, el quitosano se disuelve primero en ácido acético en solución acuosa; el fármaco se disuelve o dispersa en la solución y luego se añade el agente de reticulación adecuado. Esta solución o dispersión se atomiza en una corriente de aire caliente, lo que conduce a la formación de pequeñas gotas de disolvente, el cual se evapora al instante y da como resultado la formación de partículas que fluyen libremente (Agnihotri, 2004).

Gelificación iónica (Ionic Gelation). El utilizar complejos entre macromoléculas de carga opuesta para preparar microesferas de quitosano ha llamado mucho la atención debido a que es un proceso simple, suave y no tóxico. En este método, el quitosano se disuelve en solución de ácido acuoso para obtener el quitosano policatiónico. A continuación, esta solución se añade gota a gota a la solución del polianiónico tripolifosfato (TPP) con agitación constante. Debido a la complejidad que hay entre las especies de carga opuesta, el quitosano se somete a gelificación iónica y precipitación para formar partículas esféricas. Sin embargo, las micropartículas formadas por TPP y quitosano tienen una pobre resistencia mecánica, lo que limita su uso en la liberación de fármacos o compuestos activos (Cota et al., 2013).

Propiedades Fisicoquímicas

El quitosano es un polímero biodegradable y biocompatible. Presenta baja toxicidad comparada con otros polímeros y es muy apropiado como sistema de liberación en ambientes biológicos. Fue aprobado por la FDA para su utilización en sistemas de liberación controlada de distintos compuestos bioactivos (principalmente fármacos). Es importante considerar que la estructura química del polímero determinará el comportamiento de las nanopartículas en términos de encapsulación, degradación y liberación del compuesto bioactivo (Gómez, 2014).

A medida que las dimensiones de las nanopartículas se disminuyen, principalmente en el intervalo de 1 a 10 nm, los efectos de tamaño y su superficie son más notables. Entre los efectos más importantes se ha determinado el confinamiento de los electrones, en el que, por ejemplo, se ha observado que las nanopartículas metálicas tienen manifestaciones de efectos cuánticos en el material, que pueden percibirse a través de sus propiedades

magnéticas y/o de conducción electrónica; algunas poseen propiedades termodinámicas, como la capacidad calorífica (Borovitskaya y Shur, 2002).

Los efectos de superficie son de gran importancia en las nanopartículas, ya que se tiene un incremento en áreas superficiales por unidad de volumen y en energías libres superficiales respecto a los sólidos volumétricos (Israelachvili, 1991). Debido a que los átomos en la superficie de la nanopartícula están menos “enlazados” que el resto de sus átomos y su esfera de coordinación está incompleta, lo que incrementa la energía libre superficial, afectando propiedades como la temperatura de fusión y la reactividad química (Gutiérrez, 2006).

Se ha observado que el quitosano de medio peso molecular (MPM) causa un efecto sobre el tamaño de partícula. La relación lineal entre el quitosano MPM y el tamaño de partícula/potencial zeta se ha demostrado estadísticamente, lo que proporciona una plataforma para una fácil manipulación de las propiedades físicoquímicas de los nanopartículas adecuadas para su previa aplicación. Se ha encontrado que esto puede aumentar el efecto antifúngico significativamente. Por lo tanto, se prevé que las nanopartículas de quitosano tienen el potencial de convertirse en un agente antifúngico natural, siendo más potentes y seguros (Goycoolea et al., 2012).

Propiedades Antimicrobianas

Una de las principales propiedades de las nanopartículas es su actividad antimicrobiana. Esta capacidad proviene naturalmente de los sistemas de quitosano ya nanoparticulado, esto porque es un biopolímero catiónico, siendo su mecanismo de acción principal el desestabilizar las membranas microbianas con cargas negativas presentes mientras interaccionan con las cargas positivas de quitosano (-NH₂).

Se ha ido ampliando el estudio de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas en diversos campos. Uno de los campos más estudiados es en el de la biomedicina, en donde se ha observado que las nanopartículas de plata poseen una fuerte actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* debido a la mayor superficie de contacto con las membranas de las bacterias. Algunos autores han evidenciado la presencia de aglomeraciones en la superficie de la pared celular microbiana (Cota et al., 2013).

Estos estudios han demostrado que las nanopartículas de plata causan toxicidad a las bacterias a través de proteínas de la membrana, junto con la generación de daño oxidativo. Se cree que el mecanismo de acción por el cual las nanopartículas pueden inducir toxicidad a las bacterias es a través de la inducción de estrés oxidativo de los lípidos, causando daño a los carbohidratos, las proteínas y el ADN, lo que posteriormente causa la muerte del microorganismo (Fang et al., 2007).

Se han realizado pocos estudios acerca del efecto que tienen las nanopartículas de quitosano sobre la inhibición del crecimiento de los hongos. Al igual que se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano poseen un potencial antifúngico frente a hongos filamentosos como *A. parasiticus* (Luque-Alcaraz et al., 2016), observándose incluso un mayor potencial antifúngico en comparación con la disolución de puro quitosano (Hernández, 2016).

Aplicaciones

Hoy en día, existen diversos estudios sobre la encapsulación de compuestos en micro y nanopartículas a base de quitosano (Tabla 3). Dado que la industria farmacéutica es el área principal de aplicación de las matrices a base de quitosano para la liberación controlada de fármacos, la mayoría de los procesos para obtener micro y nanopartículas han sido adaptados a estas áreas. Las nanopartículas son las más estudiadas como matrices para los sistemas de administración de fármacos, especialmente por su funcionalidad la cual es mayor debido a su menor tamaño, lo que permite una administración oral, nasal o dérmica con más facilidad (Cota et al., 2013).

Por muchos años, los métodos convencionales utilizados de control de plagas han sido los pesticidas químicos tales como los piretroides, organofosforados, carbamatos y organoclorados. Sin embargo, su utilización causa un grave daño ambiental y problemas a la salud humana debido a su alta toxicidad (Avery, 2006). Es por ello que el uso del quitosano es una gran alternativa, ya que este se utiliza en matrices para la liberación de compuestos activos, principalmente medicamentos y antimicrobianos potentes, como micro y nanopartículas, ya sea solas o cargadas con iones metálicos (Escobichon, 2001).

Tabla 3. Desarrollo y aplicaciones de compositos de quitosano con compuestos bioactivos.

Composito	Microorganismo	Compuesto Bioactivo	Referencia
Np'sQ* con aceites esenciales	• <i>Pectobacterium carotovorum</i>	Tomillo	Sotelo et al., 2015
	• <i>Salmonella sp</i>	Limón	Luque et al, 2016
	• <i>Aspergillus parasiticus</i>	Lima	Chafer, 2008
		Hoja de árbol de pirul (<i>Schinus molle</i>)	

Np'sQ con metales	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus mutans</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Candida albicans</i> 	Cu, Ag, Zn, Au	Trepiana, 2015 Ayala, 2015 Flores, 2005 Molina, 2010
Np'sQ con agentes antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	Extractos de mora (<i>Rubus glaucus</i>)	Porras et al., 2012
Np'sQ con lisozima	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Escherichia coli</i> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • Degradación enzimática • Hongos filamentosos • Bacterias Gram positivas y Gram negativas 	Lisozima	Duan et al., 2007 Yomota et al., 1990 Hernández et al., 2016

*Nanopartículas de quitosano

Sobre la base de estas propiedades, es importante ampliar el campo de estudio a otras áreas en las que las propiedades del quitosano pueden ser explotadas, en conjunto con otros compuestos bioactivos naturales que son útiles en la alimentación y la agricultura, con el fin de erradicar los problemas asociados al uso indebido de los productos agroquímicos y plaguicidas (Cota et al., 2013).

Se ha encontrado que las partículas de quitosano poseen un potencial antifúngico frente a *Aspergillus parasiticus*, el cual es mayor que el efecto del quitosano en disolución. Se han evidenciado daños que se caracterizan por cambios morfológicos en las hifas y esporas, lo que sugiere que los nanopartículas de quitosano podrían ser capaces de difundirse en la célula fúngica y por lo tanto alterar la síntesis de ADN, así como del ARN. Esto podría explicar la mejor actividad antifúngica por parte de las nanopartículas en comparación con el polímero libre o en forma de solución (Hernández et al., 2016).

Con base a lo anterior, es importante ampliar el estudio sobre las nanopartículas elaboradas a partir de mezclas de quitosano con compuestos bioactivos, para obtener materiales con un efecto antimicrobiano más efectivo.

Bionanocompositos de Quitosano/lisozima

Lisozima

La lisozima, también conocida como muramidasa (N-acetil muramidaglicano hidrolasa), tiene una masa molecular de 14.3 Da y está compuesta por una secuencia de 129 residuos de aminoácidos (You et al., 2010). En el sitio catalítico se encuentran dos aminoácidos, Glu 35 y Asp 52, que son necesarios para que ocurra la catálisis (Callewaert y Michellies, 2010; Ibrahim et al., 1998).

La lisozima es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), debilitando así la pared celular (Carrillo, 2013). El resultado es la penetración de agua en la célula, que se hincha y acaba por estallar, un fenómeno denominado lisis (Figura 3).

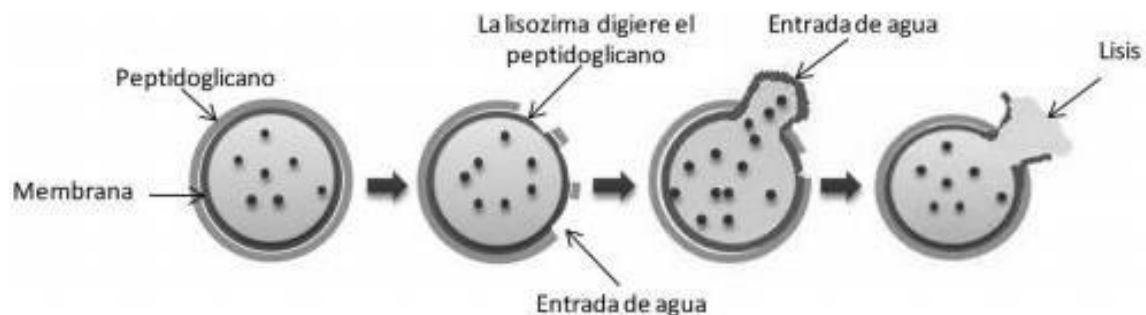


Figura 3. Liberación del protoplasto debido a una lisis en la membrana citoplasmática.

Fuente: Carrillo, 2013.

En la actualidad, existe gran interés por los agentes antimicrobianos de origen natural, debido a que por lo general presentan baja toxicidad, amplio espectro microbiano y su obtención es económica. Por ejemplo, desde hace décadas, en la industria alimentaria se utilizan como conservantes a la nisina (una bacteriocina) y a la lisozima de huevo (Pellegrini et al., 2003).

Se han desarrollado métodos que buscan potenciar el espectro antibacteriano de la lisozima de huevo mediante la combinación de tratamientos térmicos y químicos (Cegielska et al., 2009). La lisozima de clara de huevo es una de las proteínas alimentarias utilizada en

la industria para diferentes fines, por su demostrada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y su actividad antiviral (Carrillo, 2013).

Se ha demostrado que nanopartículas cargadas con quitosano/lisozima y ácido poly-gama-glutámico muestran actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, siendo *B. subtilis* la especie más susceptible a la lisozima. Cuando se cargaron las nanopartículas de quitosano/lisozima con ácido poly-γ-glutámico, el crecimiento bacteriano se retrasó considerablemente, dando como resultado un amplio espectro antibacteriano y un prolongado período de inhibición del crecimiento (Yong et al., 2013).

Estudios recientes sobre bionanocompositos de quitosano cargados con lisozima han reportado que las nanopartículas preparadas por gelación ionotrópica presentan un diámetro de 150 nm, además de mantener de manera eficaz la actividad antibacteriana de la enzima (lisozima) contra *Staphylococcus epidermidis* hasta 5 días después de su incubación (Hernández et al., 2016).

En 2013, Cota y colaboradores realizaron un estudio en el que se evaluó el efecto antifúngico que ocasionan las nanopartículas de quitosano cargadas con tripolifosfato (TPP) sobre el hongo *Aspergillus parasiticus*. Se encontró que las nanopartículas ocasionaron un daño característico provocando cambios morfológicos dentro de las hifas y esporas, lo cual fue similar a lo reportado por Hernández et al. (2016).

Se ha demostrado que hongos filamentosos productores de toxinas como *Aspergillus parasiticus* son sensibles a compuestos naturales bioactivos. Rasooli y Abyaneh (2004) encontraron que el aceite de timol inhibe el crecimiento *in vitro* del micelio de *A. parasiticus*, asociándose con una disminución significativa en la producción de aflatoxinas.

De igual modo, se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano (a una concentración de 5×10^{-3} g/mL) muestran un efecto antifúngico sobre *A. parasiticus*, lo cual se atribuye al aumento en el área de contacto debido al pequeño tamaño de las nanopartículas, las cuales pueden ser capaces de penetrar en la célula e interactuar con componentes vitales para el crecimiento de hongos. En un estudio similar, recientemente se encontró que las nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial de pirul (*Schinus molle*) disminuyen significativamente la viabilidad de esporas de *A. parasiticus* en pruebas *in vitro* (Luque-Alcaraz et al., 2016).

***Aspergillus* spp.**

Generalidades

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita). *Aspergillus* es un género de hongos filamentosos hialinos ubicuos, productores de enfermedades de distribución universal que ocasionalmente pueden aparecer en forma de brotes hospitalarios tras obras de remodelación (Alcalá et al., 2008).

Este género pertenece a la división *Deutoromycota*, clase *Hypgomycetes*, orden de los *Hyphomycetales* y familia *Moniliaceae* (Ortega, 2002). Los *Aspergillus* se caracterizan por tener micelio vegetativo compuesto de hifas septadas, ramificadas, incoloras, estructura conidial desarrollada como pedicelos y cabezuelas de origen en células hifales especializadas (células del pie), de paredes gruesas, las cuales producen conidióforos como ramas, aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la célula del pie (Figura 4) (García y Verástegui, 2001).

Con respecto a su morfología, se sabe que el color es la principal característica macroscópica para su identificación. Estos son de colores verde, pardo, amarillo, blanco gris o negro (Velez, 2010). A su vez, en el microscopio el conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), conidióforo (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio) (Abarca, 2000).

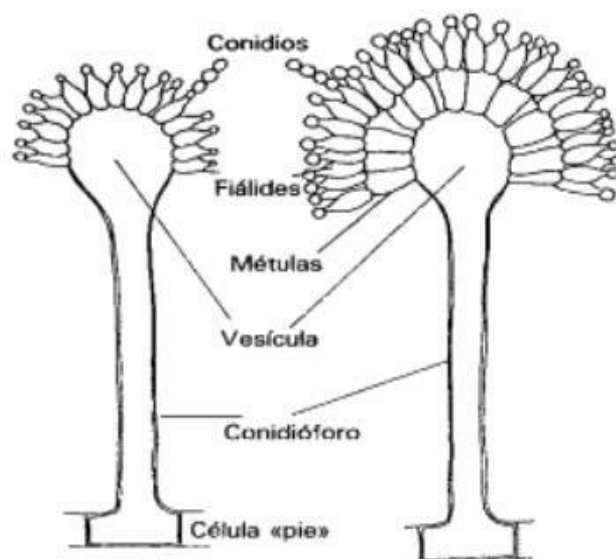


Figura 4. Morfología de *Aspergillus* spp.

Fuente: Alcalá et al., 2008.

Aspergillus es un ejemplo de lo que denominamos "patógeno oportunista", es decir, que suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran: el pequeño tamaño de sus conidios, que permite que sean aspiradas y que pueda causar infección en el pulmón y en los senos paranasales; su capacidad de crecer a 37 °C, lo que le hace idóneo para afectar al humano; su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales; su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos y también la producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos (elastasa, restrictocina, fumigatoxina, etc.) (Alcalá et al., 2008).

Sus efectos tóxicos están relacionados principalmente con intoxicaciones alimentarias, como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas y metabolitos extracelulares (INSHT, 2012). Algunas de las principales especies de *Aspergillus* se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Especies del género *Aspergillus* spp. (INSHT, 2012).

Agente biológico	Sustancia tóxica	Efecto tóxico
<i>A. clavatus</i>	Patulina	Neurotóxico
<i>A. flavus</i>, <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina	Hepatotóxico, inmunotóxico
<i>A. ochraceus</i>, <i>A. niger</i>	Ochratoxina A	Nefrotóxico
<i>A. oryzae</i>, <i>A. terreus</i> <i>A. niveus</i>	Citrinina	Nefrotóxico
<i>A. versicolor</i>, <i>A. nidulans</i>	Esterigmatocistina	Hepatotóxico

Aspergillus parasiticus

Los ascomicetos son un grupo de hongos con cerca de 60,000 especies que producen varias enfermedades vegetales graves. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* producen un

metabolito, la aflatoxina, la cual se encuentra en ocasiones en los productos que contienen maíz y trigo (Marcel, 2005).

Aspergillus parasiticus es considerado principalmente como hongo de almacenamiento, ya que puede proliferar y causar infección durante la conservación de los alimentos, aunque se aísla con frecuencia de productos precosecha tales como el maíz, trigo, cacahuate, algodón, nueces, etc. Esto se debe principalmente a sus condiciones de crecimiento, ya que crece a una humedad relativamente alta, una temperatura de 25 a 40 °C siendo la óptima de 28 °C y un valor mínimo de Aw de 0.83 (Bennett y Klich, 2003).

Esta especie se distingue con facilidad por sus características morfológicas bien definidas. Macroscópicamente presenta colonias de un diámetro de 40 a 50 mm, con una tonalidad amarillentas y verdosas, que con el tiempo empiezan a oscurecer. En cuanto a sus características microscópicas, se ha observado que posee cabezas conidiales uniseriadas de más de 400 micrómetros de diámetro, conidióforo ligeramente rugoso e incoloro de más de 200 micrómetros de longitud, vesículas sublogosas o globosas y conidios globosos de color verdoso amarillento (Gao et al., 2007; Abarca, 2000).

Importancia. Esta especie puede producir toxinas, sustancias químicas tóxicas con estructuras químicas semejantes, de bajo peso molecular (metabolitos secundarios), las cuales se producen de forma natural por la estructura micelial del hongo, o bien, por sus esporas. Los metabolitos secundarios son producidos al final de la fase de crecimiento exponencial, y al parecer no tienen repercusión en el desarrollo y crecimiento del hongo (Del Carmen et al., 1993). Cabe mencionar que el hongo *A. parasiticus* produce aflatoxinas, la cual puede llegar a producir daños en la salud tanto de animales como humanos, pudiendo ocasionar por ejemplo cáncer de hígado si se llega a ingerir (Urrego y Diaz, 2006).

Estructura celular. La pared es una estructura específica de la célula fúngica y es muy diferente de la pared de las células vegetales, compuesta fundamentalmente de celulosa. Los hongos son organismos eucarióticos con pared celular compuesta de glicoproteínas, quitina y glucano; pueden ser unicelulares o multinucleados, con nutrición abortiva y se clasifican en el reino Fungi de acuerdo a la clasificación de Whittaker (Buitimea-Cantúa, 2012).

Glicoproteínas. Las proteínas representan el 30-50 % del peso seco de la pared en los hongos levaduriformes y el 20-30 % del peso seco de la pared de los hongos filamentosos. La mayoría de las proteínas están asociadas a glúcidos por enlaces O o N, formando glicoproteínas. Las proteínas de la pared tienen diversas funciones, participando en el mantenimiento de la forma celular, interviniendo en algunos procesos como de

adhesión, protegiendo a la célula de sustancias extrañas, participando en la absorción de moléculas, entre otras (Bowman, 2006).

Quitina. La quitina se sintetiza a partir de N-acetil glucosamina por la enzima quitina sintasa, que deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. El contenido en quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo. La cual representa el 1-2 % del peso seco de la pared celular de las levaduras mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20 % (Pontón, 2008). El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60 % del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90 %), aunque también hay glucanos con enlaces β -1,6 (en *Candida* pero no en *Aspergillus*), β -1,4, α -1,3 y α -1,4. El β -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura (Kahn, 2007).

El β -1,3-D-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetasas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1,500 residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3. A estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa, se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada (Pontón, 2008).

Este hongo forma parte de un grupo de mucha importancia en la agricultura ocasionando graves daños a la salud, así como también grandes pérdidas económicas, esto debido a que se encuentra a su gran capacidad de reproducción, lo que con frecuencia dificulta su método control, que requiere de la utilización de diversos métodos (Tabla 5).

Tabla 5. Métodos de control de hongos en alimentos.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
Químicos (fungicidas)	<ul style="list-style-type: none"> Más de 113 ingredientes activos comerciales Eficaces si se utiliza de manera adecuada 	<ul style="list-style-type: none"> Algunos hongos han producido resistencia Problemas con la salud 	Bajpai y Kang, 2010. Nameth y Chatfield, 2010. Wang et al., 2007.
Biológico	<ul style="list-style-type: none"> Bajo riesgo para la salud humana Bajo costo 	<ul style="list-style-type: none"> Su efecto dura pocos días y es necesario repetir 	Godoy, 2013. Pérez, 2007.

	<ul style="list-style-type: none"> • Se degradan fácilmente • No generan resistencia 	la aplicación	
Alternativos: <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento térmico • Aceites esenciales 	<ul style="list-style-type: none"> • Fáciles de aplicar • No dejan residuos químicos • Bajo riesgo para la salud humana 	<ul style="list-style-type: none"> • Aceleración de la maduración del producto • Daño por calor • Bajo estudio 	Benites et al., 2009. Bajpai y Kang, 2010. Tang et al., 2007.

Es por estas razones que se han buscado distintas alternativas para poder tratar con dicho hongo, con el fin de llevar a cabo un método de control más sustentable, con el fin de sustituir de control que pueden ocasionar tanto daño a la salud de animales y humanos, como con el medio ambiente.

METODOLOGÍA

Reactivación de Cepas

Se utilizó una cepa de *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992), seleccionada por ser una especie toxigénica en ocasiones presentes tanto en alimentos agrícolas como almacenes. Para su propagación, la cepa fue inoculada en matraces con agar papa dextrosa, PDA (Bioxon, USA), e incubada a 28 °C durante 4 días. A partir de este cultivo se preparó el cultivo monospórico (Quijada, 2011) en el mismo medio, con el fin de asegurar la pureza de los cultivos.

Cultivo Monospórico

El cultivo monospórico se caracteriza por provenir de una sola célula o espora, lo cual permite obtener cultivos puros. Para ello, primeramente, se preparó un inóculo a partir de las placas con el hongo *Aspergillus parasiticus* desarrollado en el punto anterior (reactivación). Se tomó la placa con la colonia más aislada desarrollada en el medio de cultivo, a la cual se adicionó un volumen de solución Tween 80, un surfactante hidrofílico que favorece la

dispersión de las esporas o propágulos fúngicos. Las esporas fueron resuspendidas mediante agitación y el inóculo preparado fue utilizado para preparar diluciones seriadas con diferente concentración de esporas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}); cada dilución fue depositada sobre una placa con medio PDA e incubada a 28 °C. Enseguida, con ayuda de una espátula estéril, se tomaron las colonias desarrolladas en los medios inoculados con las últimas diluciones (10^{-4} y 10^{-5}), en las cuales se observó una mayor dispersión de colonias, sin contaminación evidente. Las colonias cortadas fueron depositadas en placas con medio PDA estéril e incubadas nuevamente a 28 °C, a fin de obtener un cultivo monospórico.

Preparación de la Suspensión de Esporas

Se prepararon 30 mL de agar PDA, se esterilizó el medio y se dejó reposar hasta solidificar. Se inoculó con el cultivo monospórico de *A. parasiticus* y posteriormente se llevó a incubar de 4 a 5 días a 28 °C. Una vez desarrolladas, las esporas fueron resuspendidas agregando al matraz una solución de Tween-80 al 0.1 % (v/v) estéril, mediante agitación magnética por 5 min. La concentración de esporas en la suspensión fue determinada mediante conteo en cámara de Neubauer (Plascencia, 2004). Se tomó una gota con una micropipeta estéril y se colocó en el centro de la cámara de Neubauer con el cubreobjetos encima. Posteriormente se colocó la cámara en un microscopio óptico y se contó el número de esporas por cuadro. Para determinar la concentración de esporas se contaron las esporas en al menos 13 cuadros pequeños. Se calculó el número de esporas utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\# \text{ Esporas}}{\text{mL suspensión}} = (\text{Promedio de esporas})(1 \times 10^4)(25)$$

Preparación de la Solución de Quitosano

Se utilizó quitosano comercial de peso molecular medio (Sigma, USA), el cual se puso a secar en estufa a 70 °C previo a su uso; a partir de este se preparó una solución madre homogénea de volumen final de 100 mL, con la formulación: 0.05 % (p/v) de quitosano, 1 % (v/v) ácido acético al 0.05 %, aforado a 100 ml con agua miliQ. La mezcla se dejó en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente, esto para permitir dar una mayor homogeneidad. A partir de la solución madre se elaboró el biocomposito con el compuesto bioactivo en solución.

Preparación de las Nanopartículas de Quitosano-Lisozima

Las nanopartículas se obtuvieron utilizando el método de nanoprecipitación, el cual consistió en agregar 2.5 mL de una disolución de quitosano al 0.05 % (p/v), 0.05 % (v/v) de Tween 80 que actuó como el surfactante y 0.05 % (p/v) de lisozima comercial de huevo (Sigma, USA); después se añadió un volumen de 40 mL de acetona (Sigma-Aldrich, USA). El proceso se llevó a cabo bajo agitación magnética a 500 rpm y con un caudal de 0.87 mL/min, utilizando una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3, Francia). Posteriormente, la acetona se eliminó mediante rotaevaporación (Labconco 78892, USA) conectada a un refrigerante (Yamato, USA), hasta que se obtuvo un volumen aproximado a 10 mL de la muestra inicial (Luque-Alcaraz et al., 2016). Como control se utilizaron nanopartículas de quitosano sin lisozima.

Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

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

Obtención de Extractos Poliméricos Fúngicos

En matraces conteniendo caldo papa dextrosa se inoculó el hongo *Aspergillus parasiticus*, el cual se cultivó por 96 h a 28 °C. El micelio aéreo y los conidios se separaron de los matraces mediante la adición de 20 mL de NaOH 1 M, agitando durante 30 min a 60 °C. La suspensión se centrifugó a 270 × g por 5 min y el sobrenadante se resuspendió en 20 mL de agua destilada. Las suspensiones se sonicaron (Fisher Scientific, Sonic Desembrator Model 500) en un baño con hielo a 40 Hz por 5 min y se centrifugó a 18,000 × g por 1 hora. Posteriormente, el sobrenadante obtenido se lavó tres veces con agua destilada y el producto final se consideró el extracto polimérico (Claverie-Marin et al., 1986; Tunlid et al., 1991; Buitimea-Cantúa et al., 2013).

Hidrólisis de β -1,3-glucano

Se determinó la actividad hidrolítica de los bionanocompositos de quitosano y lisozima sobre el β -1,3-glucano comercial, así como también sobre los extractos poliméricos obtenidos del hongo *Aspergillus parasiticus*. Las estimaciones se llevaron a cabo de acuerdo a la tasa de producción de azúcares reductores. La mezcla de ensayo consistió en 12 μ L de la fracción antifúngica a una concentración de 5 mg/mL, 125 μ L de sustrato laminarina (L9634, Sigma-Aldrich, USA) o el extracto polimérico fúngico obtenido, 10 μ L de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, USA) y 362 μ L de buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5.2). Esta mezcla se incubó durante 25 min a 37 °C y los productos de hidrólisis del sustrato se estimaron como azúcares reductores por el método de Somogyi y Nelson (Buitimea-Cantúa et al., 2013).

El reactivo de Somogyi se preparó de la siguiente manera: el día que se va usar, colocar 4 mL de la solución B en un matraz aforado de 100 mL, completar con la solución A y mezclar.

- Solución A: Disolver 50 g de carbonato de sodio anhidro, 50 g de sal Rochelle, 40 g de bicarbonato de sodio y 400 g de sulfato de sodio anhidro en 1600 mL de agua destilada, y diluir a 2000 mL. Mezclar y filtrar la solución si no queda clara. Almacenar a temperatura ambiente. Si se forman sedimentos a los pocos días, filtrar nuevamente.
- Solución B: Disolver 150 g de sulfato de cobre penta-hidratado en agua destilada y diluir a 1000 mL. Adicionar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y mezclar.

Reactivo de Nelson: Mezclar 25 g de molibdato de amonio en 450 mL de agua destilada, 21 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0.6 g de arsenato monoácido de sodio en 25 mL de agua destilada. Llevar a volumen de 500 mL e incubar a 37 °C por 24-48 h. Almacenar en botellas opacas protectoras de luz.

Ensayos Microbiológicos

Preparación de Cultivos en Microplaca

En una microplaca de 16 pocillos se coloraron los cultivo control, con bionanocompositos de quitosano y quitosano con lisozima, cada uno por triplicado. Previo al ensayo, en cada pocillo se colocó un portaobjetos cortado en forma circular, de 1.5 cm de diámetro. Posteriormente, en cada posillo se agregaron 700 μ L del medio de cultivo líquido (Czapek) y

300 μ L de las nanopartículas para los tratamientos y agua destilada para el control. Después se le añadió el inóculo previamente calculado por la técnica de suspensión de esporas, incubando a 28 °C por 24 horas.

Germinación de Esporas

Esta técnica consistió en determinar el porcentaje de esporas que germinaron durante el lapso de incubación. El ensayo se realizó en microplacas de 12 pozos de acuerdo al procedimiento antes descrito. Al finalizar el periodo de incubación los portaobjetos con las esporas adheridas fueron retirados de los pocillos y montados sobre portaobjetos, para su posterior observación. De cada tratamiento se capturaron imágenes del hongo a las 24 h de su incubación, utilizando un microscopio óptico Olympus CX311 (Japón) equipado con cámara Infinity 1 (Media Cybernetics, USA). De cada pozo se contaron al azar un total de 200 esporas (germinadas y no germinadas) y se calculó el porcentaje de esporas germinadas (Martínez-Camacho et al., 2010). Una espora se consideró germinada cuando la longitud de su tubo germinal alcanzó el doble del diámetro total de la espora (Plascencia-Jatomea et al., 2003).

Análisis Morfométrico

Las imágenes capturadas de la germinación de esporas fueron procesadas utilizando el programa para análisis de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc., USA). Se midió el diámetro de las esporas, para lo cual se tomaron aproximadamente 60 mediciones por tratamiento, a 40x (Luque-Alcaraz et al., 2016). Se utilizó un microscopio óptico Olympus CX311 (Japón) conectado a una cámara Infinity 1 (Media Cybernetics, Inc., USA).

Viabilidad Celular

Este análisis fue llevado a cabo utilizando una tinción con azul de tripán (azul diamina, azul niágara, azul vital). Este colorante es un derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas (Ehrlich, 1904).

De las microplacas incubadas en los ensayos de germinación de esporas se tomaron 100 μ L de cada tratamiento y se depositaron en un portaobjetos; después se le agregaron 100 μ L de azul de tripán y se dejó reposar por 20 min. Pasados este tiempo se observó en el microscopio Olympus conectado a una cámara Infinity 1. Las imágenes captadas se procesaron en el programa Image Pro-Plus versión 6.3 (Media Cybernetics Inc., USA). De

cada tratamiento se contabilizó el número de esporas viables (no teñidas) y no viables (teñidas de azul).

Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores

Para llevar a cabo las observaciones de daño celular, septos y filamentos de actina, se utilizó un microscopio invertido (Leica DMI8, USA) equipado con filtros de fluorescencia (filtro DAPI excitación 350/50 y emisión 460/50, filtro FITC excitación 480/40 y emisión 527/30, filtro RHOD excitación 546/10 y emisión 585/40), cámara enfriada DFC 450C (Leica) y software overlay de fluorescencia (LAS AF versión 3.1.0, Leica Microsystem, USA). Se tomaron imágenes de las cepas desarrolladas bajo las mismas condiciones de cultivo utilizadas en la germinación microbiana y viabilidad de esporas. Las células se tiñeron con los marcadores de yoduro de propidio, blanco de Calcoflúor y faloidina.

Tinción con Yoduro de Propidio

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

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

Tinción con Blanco de Calcoflúor

La técnica del Blanco de Calcoflúor se basa por una parte, en la propiedad que tiene dicha sustancia de emitir fluorescencia al ser activada por radiación ultravioleta, y por otra, en la afinidad que presenta por la celulosa y la quitina presentes en la pared celular de los organismos fúngicos (Ramos et al., 2006). Esta tinción se llevó a cabo utilizando una solución de Blanco de Calcoflúor (Fluostain I, Sigma, USA) a una concentración de 10 μ g/mL. El colorante emite fluorescencia cuando se adhiere a quitina y a glucanos, permitiendo de este modo la visualización de las paredes celulares y septos del hongo. Las imágenes fueron

obtenidas mediante microscopía de fluorescencia, utilizando un filtro azul-violeta a una longitud de onda de emisión y excitación de 330-380 y >420 nm, respectivamente (Plascencia, 2004).

Tinción con Faloidina

La faloidina es una toxina fúngica de *Amanita phalloides* que se une a actina F. Como resultado de la unión con la faloidina, los filamentos de actina se vuelven fuertemente estables y emiten una coloración roja, permitiendo la observación de los filamentos presentes en las esporas.

La solución madre de faloidina se preparó utilizando metanol o DMSO a una concentración de 0.1-5.0 mg/mL. La tinción final se preparó en una solución acuosa en un intervalo de concentración de 0.1 a 100 mM, con tiempos de incubación de 15 min hasta 72 h. Las esporas del hongo previamente desarrolladas sobre los cubreobjetos fueron tratadas mediante inmersión en solución fijadora de paraformaldehído al 3.7 % (Sigma, USA), el cual fue preparado en solución buffer de fosfatos (PBS 1x, Sigma-Aldrich) y se agregó una solución de tritón X-100 (Sigma, USA) a una concentración de 0.2 % (v/v).

Las muestras se incubaron con la solución fijadora por 30 min a temperatura ambiente y una vez terminado el tiempo de incubación se llevaron a cabo tres lavados, de tres minutos cada uno, con solución de PBS 1x (Sigma-Aldrich).

Las células se tiñeron con 50 mg/ml de solución conjugada en PBS (que contiene 1 % DMSO a partir de la solución madre original) y se dejaron reposar 30 min. Finalmente, se lavaron varias veces con PBS (Sigma-Aldrich) para eliminar el exceso de colorante y se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia (Leica DMi8, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los bionanocompositos sobre la actividad hidrolítica

Debido a que el β -1,3-glucano es uno de los principales componentes de la pared celular de las especies de *Aspergillus*, en este trabajo se buscó la inhibición de la síntesis de dicho polisacárido mediante el tratamiento con los bionanocompositos. La inhibición de alguna enzima puede detener la cadena de reacciones metabólicas dentro del organismo, ejerciendo así un gran efecto inhibitorio, posteriormente llevando a la muerte del microorganismo (Berg, 2002).

Para ello, se llevó a cabo la determinación del efecto de las nanopartículas de quitosano y de quitosano-lisozima sobre la actividad hidrolítica de los extractos poliméricos obtenidos del hongo *Aspergillus parasiticus*, de acuerdo a la tasa de producción de azúcares reductores (Li et al., 2003).

Se elaboró una curva estándar de glucosa como medio de control (Figura 5) y se evaluó el efecto de la β -1,3-glucanasa de *Aspergillus niger* (Sigma, USA) sobre la laminarina (Sigma, USA), la cual es un sustrato hidrosoluble que actuó como el β -1,3-glucano.

Los resultados obtenidos mostraron que las nanopartículas de quitosano y de quitosano/lisozima presentaron una fuerte actividad hidrolítica sobre el β -1,3-glucano, encontrando una mayor concentración de azúcares reductores con respecto a los controles (Tabla 6). Lo anterior sugiere que el tratamiento con las nanopartículas permite la hidrólisis del β -1,3-glucano o bien inhibe la acción de la β -1,3-glucanasa, enzima involucrada en la síntesis y ensamblaje de la pared celular (Vargas-Arispuro et al., 2009), por lo que pueden ser una alternativa viable como agentes antifúngicos.

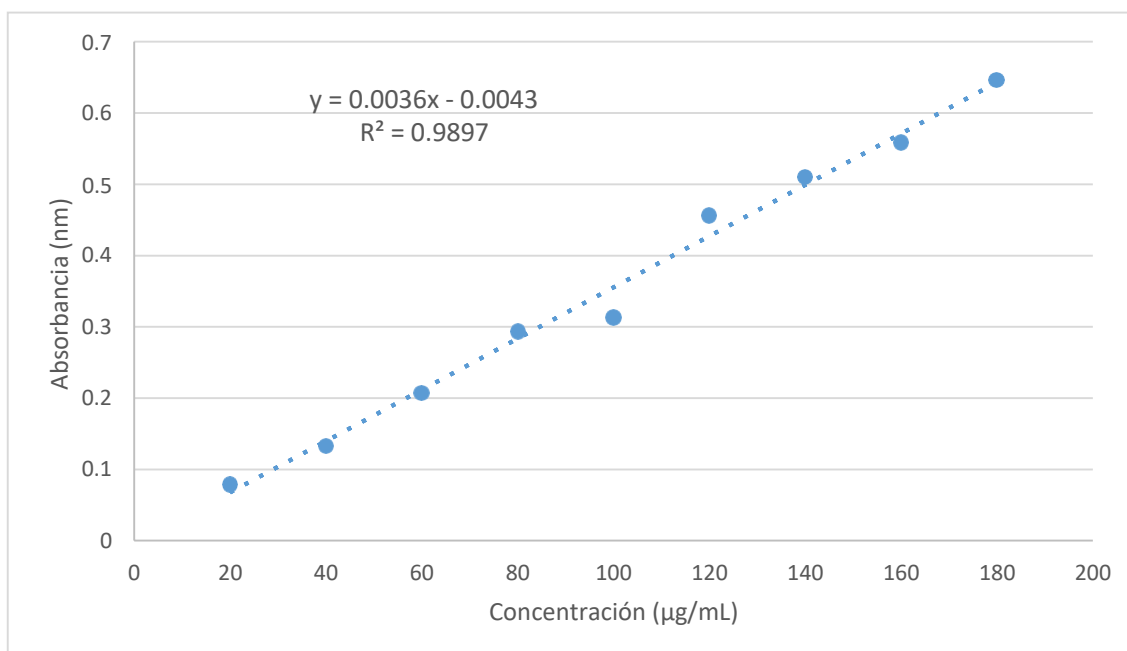


Figura 5. Curva estándar de glucosa utilizada para la cuantificación de azúcares reductores.

Tabla 6. Producción de azúcares reductores de glucosa.

Tratamiento	Azúcares reductores (µg/mL)
Control 1 (Laminarina/ β -1,3-glucanasa)	49.364
Control 2 (Inóculo sin tratamiento)	34.639
Quitosano/Extracto	54.083
Np's Q*/Extracto	61.861
Np's Q/Lisozima/Extracto	58.250

*Nanopartículas de Quitosano

Con la finalidad de verificar el grado de interferencia del medio de cultivo en la determinación, específicamente del caldo papa dextrosa (Bioxon, USA), se volvió a repetir la prueba sin usar los extractos poliméricos. Para ello primeramente se cultivó el hongo *Aspergillus parasiticus* en el medio caldo papa dextrosa, incubando a 28 °C por 96 horas. Transcurrido el tiempo, se determinó la actividad hidrolítica de cada tratamiento directamente sobre el caldo papa dextrosa, a fin de evaluar si hay alguna diferencia con respecto a los tratamientos adicionados con los extractos poliméricos.

De acuerdo a los resultados, los valores de absorbancia obtenidos fueron elevados (Tabla 7), por lo que se considera que el medio de cultivo no es adecuado para la cuantificación. Esto se pudo deber a que el caldo papa dextrosa se compone principalmente

de glucosa (dextrosa) y almidón, siendo la glucosa la que mayor interfirió en la determinación de la actividad hidrolítica en la al ser un azúcar reductor. Asimismo, el almidón también interfiere en la lectura de los azúcares reductores, aunque en menor medida, esto se debe a que el almidón está compuesto de dos polisacáridos, la amilosa y amilopectina, por lo que estos junto con la glucosa no permitieron detectar que efecto ocasionaban los tratamientos sobre el hongo.

Tabla 7. Producción de azúcares reductores utilizando caldo papa dextrosa como medio de cultivo para evaluar la capacidad hidrolítica.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Control (extracto)	58.50 \pm 0.16
Control (directo)	588.40 \pm 14.83
Np's Q	510.40 \pm 3.29
Np's Q/Lisozima	516.60 \pm 26.14

Los valores representa la media de $n=3 \pm$ error estándar.

*Nanopartículas de Quitosano

Con base a lo anterior, se optó por repetir la misma prueba utilizando medio de cultivo líquido Czapek, incubando a 28 °C por 96 horas. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Producción de azúcares reductores utilizando caldo Czapek como medio de cultivo para evaluar la capacidad hidrolítica. Comparación de medias por Tukey ($P \leq 0.05$).

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Control (Tween)	501.11 \pm 7.25 ^c
Np's Q	124.54 \pm 6.25 ^a
Np's Q/Lz	173.06 \pm 13.71 ^b

Los valores representa la media de $n=3 \pm$ error estándar.

*Nanopartículas de Quitosano

Al comparar los resultados de las tablas 7 y 8 se encontró que el medio líquido Czapek es el recomendable para realizar la prueba debido a que no interfiere en la

determinación. Esto se debe a la composición, basada en sales minerales y sacarosa como fuente de carbono.

Se observó que los tratamientos con las nanopartículas de quitosano y de quitosano-lisozima tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo, afectando de manera significativa ($P < 0.05$) la producción de β -1,3-glucano o la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa, componente principal de la pared celular y enzima que lleva a cabo la síntesis del β -1,3-glucano, respectivamente. Asimismo, es posible que afecten otros componentes celulares o enzimas importantes para el metabolismo del hongo.

Viabilidad de esporas mediante tinción con azul de tripán

La determinación de la viabilidad de esporas es un parámetro de control muy útil para realizar cultivos *in vitro*. Entre las técnicas utilizadas se encuentra la tinción con el colorante azul de tripán, el cual tiñe sólo aquellas esporas que presentan daño en la membrana plasmática permitiendo la diferenciación entre las esporas que son viables y las no viables. Para evaluar el efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad de las esporas del hongo, en este estudio se mezclaron 700 μ L del inóculo resuspendido en caldo Czapek y 300 μ L de la solución de nanopartículas. Como control se adicionó agua destilada (control agua).

Al observar los resultados no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) notables entre los tratamientos de las nanopartículas de quitosano y de quitosano-lisozima (Figuras 6 y 7); sin embargo, si se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a los controles. En el control de agua destilada (Figura 6) se contabilizó un mayor número de esporas viables y la germinación de las mismas fue considerablemente mayor ($P < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos, en dónde no se encontraron esporas germinadas.

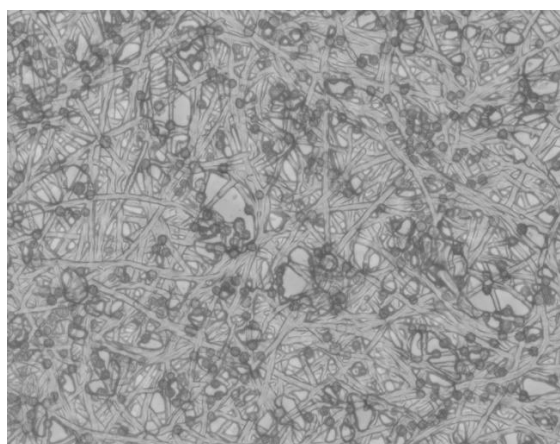


Figura 6. Micelio de *Aspergillus parasiticus* desarrollado en medio control (A), observado a las 24 horas de incubación a 28°C, a 40x., observadas a las 24 horas de incubación a 28 °C, a 40x.

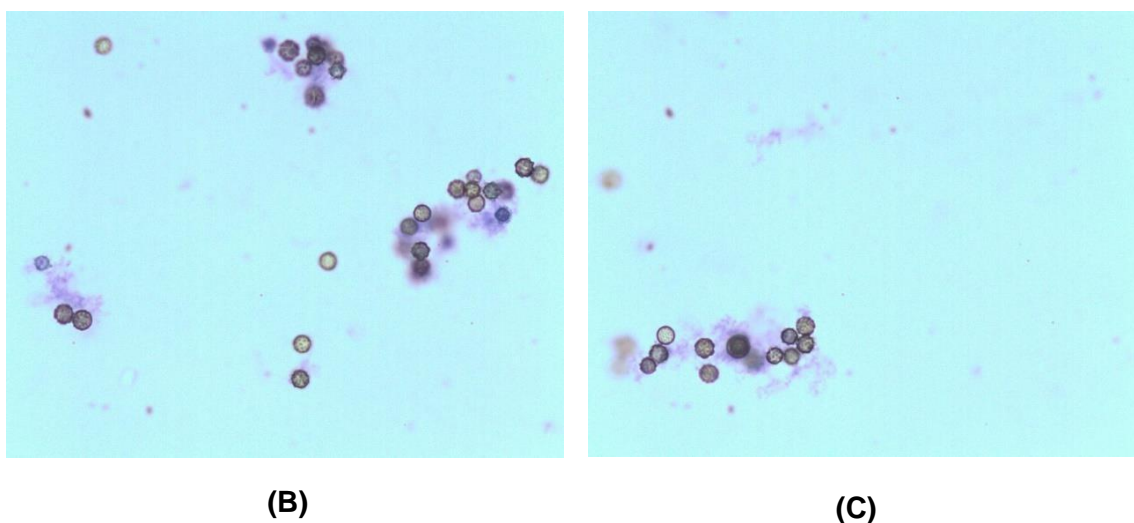


Figura 7. Esporas de *Aspergillus parasiticus* inoculadas en medio adicionado con nanopartículas de quitosano (B), observadas a las 24 horas de incubación a 28°C, a 40x. Esporas de *A. parasiticus* inoculadas en medio con nanopartículas del biocomposito quitosano/lisozima (C), observadas a las 24 horas de incubación a 28°C, a 40x.

Con respecto al tratamiento del hongos con las nanopartículas de quitosano y de quitosano-lisozima, se observó que en ambos el colorante logró atravesar la pared celular de las esporas, tiñéndolas (Figura 7). Esto indica que ambos tipos de nanopartículas exhiben un importante efecto inhibitorio. Cabe mencionar que en el tratamiento con las nanopartículas de quitosano cargadas con lisozima se observó una menor cantidad de esporas viables con respecto al tratamiento con las nanopartículas de sólo quitosano, tal como se muestra en la figura 7 (derecha).

Análisis morfométrico

Se midió el diámetro promedio de las esporas mediante análisis de imágenes utilizando un microscopio Olympus conectado a una cámara Infinity 1. Las imágenes captadas se procesaron en el programa Image Pro-Plus versión 6.3 (Media Cybernetics Inc., USA), con el fin de conocer que efecto de los bionanocompositos sobre las esporas del hongo.

Los resultados mostraron que los tratamientos con las nanopartículas ocasionan un ligero incremento en el diámetro promedio de las esporas (Tabla 9), lo cual se puede relacionar con el estrés osmótico.

Tabla 9. Efecto de los bionanocompositos de quitosano y quitosano-lisozima sobre la morfometría de *Aspergillus parasiticus*. Comparación de medias con Tukey (P>0.05).

Tratamiento	Diámetro promedio de las esporas (µm)
Control agua	4.69 ± 0.074 ^a
Nanopartículas de Quitosano-Lisozima	4.76 ± 0.070 ^a
Nanopartículas de Quitosano	4.90 ± 0.074 ^a

Valores promedio de tres mediciones ± error estándar.

Se observó que las esporas en el control de ácido y el control de agua presentaron un menor tamaño comparado con los tratamientos de las nanopartículas de quitosano y las nanopartículas de quitosano lisozima, esto se pudo deber a que, dichos tratamientos lograron atravesar la pared celular del hongo, ingresando de esta forma en el interior de la espora, lo que provoco una hinchazón en toda la espora por la cantidad de bionanocompositos que se acumularon, lo que a su vez puede provocar una mayor cantidad de rupturas.

Germinación de Esporas

Las mismas preparaciones utilizadas para medir la morfometría de las esporas fueron utilizadas para contabilizar el número de esporas germinadas. Para ello se contaron un total de 200 esporas (tanto germinadas como no germinadas) y se calculó el porcentaje de germinación (Plascencia-Jatomea et al., 2003).

En los tratamientos con nanopartículas de quitosano y quitosano-lisozima, no se encontraron esporas germinadas (cero por ciento de germinación), lo que confirma el fuerte efecto inhibitorio sobre las esporas de *Aspergillus parasiticus* con respecto al control (Tabla 10). Los resultados muestran que el hongo es altamente susceptible al ácido, observando <1% de esporas germinadas en el control acidificado.

Tabla 10. Efecto de los bionanocompositos de quitosano y quitosano-lisozima sobre la germinación de las esporas de *Aspergillus parasiticus*.

Tratamiento	Esporas germinadas (%)
Control de agua	87.6
Nanopartículas de quitosano	0.0
Nanopartículas de quitosano-lisozima	0.0

Al relacionar los resultados de la morfometría y la germinación de esporas se encontró que ambos tipos de nanopartículas, además de inhibir la germinación de las esporas incrementan el diámetro promedio de las mismas comparadas con los controles, encontrando esporas más hinchadas en el medio adicionado con las nanopartículas del biocomposito. Esto se puede atribuir al tamaño que poseen las nanopartículas, lo cual les permite penetrar con mayor facilidad a través de la pared celular del hongo, siendo capaces de interactuar con el material celular dentro de la espora, deteniendo de esta forma el desarrollo del metabolismo del hongo.

Análisis de Fluorescencia Utilizando Biomarcadores

Ioduro de propidio (IP)

Como ya se mencionó anteriormente, cuando este colorante emite fluorescencia en el interior de las células, es indicador de que logró ingresar en la espora, dando por hecho que la integridad de la membrana celular está comprometida y que posiblemente la célula se encuentra no viable (o dañada). En este trabajo, al observar el micelio del hongo desarrollado en el medio control (Figura 8) se encontró una abundante cantidad de esporas germinadas, con formación de hifas, sin evidenciar fluorescencia al interior de las células. Lo anterior indica que la membrana se encuentra intacta, permitiendo que el hongo continúe su metabolismo y desarrollo de manera normal.

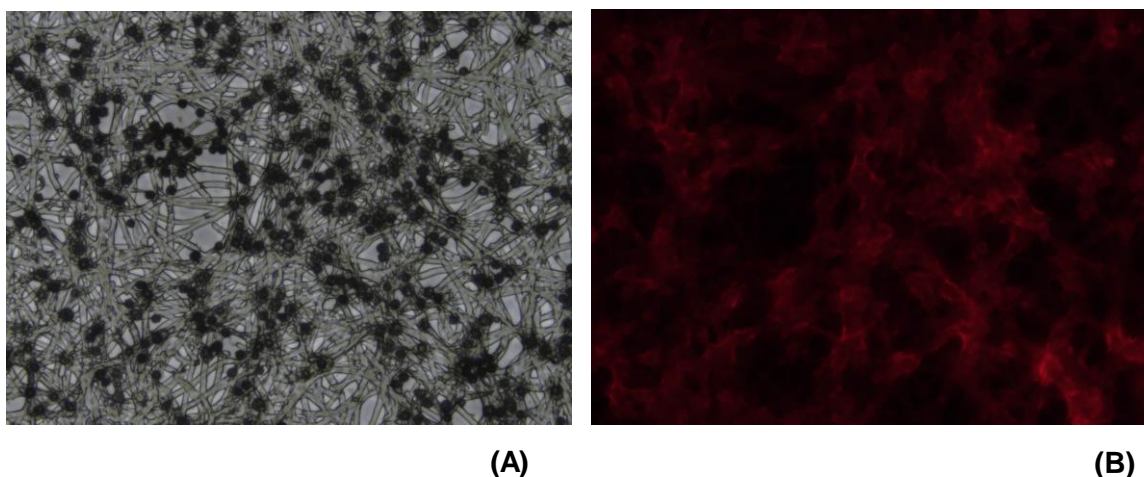


Figura 8. Esporas e hifas de *Aspergillus parasiticus* desarrolladas en medio control, a las 24 horas, teñidas con solución de ioduro de propidio, a 40x. Campo claro (A) y campo con fluorescencia (B).

En contraste, en los tratamientos con las nanopartículas de quitosano y quitosano-lisozima se apreciaron esporas una coloración muy intensa, indicando que el yoduro de propidio ingresó dentro de las esporas (Figura 9), derivado de los daños ocasionados en la pared celular del hongo. No se observaron diferencias notables entre las esporas inoculadas en ambos tratamientos, lo cual coincide con los resultados encontrados al analizar el efecto sobre la germinación (Tabla 10).

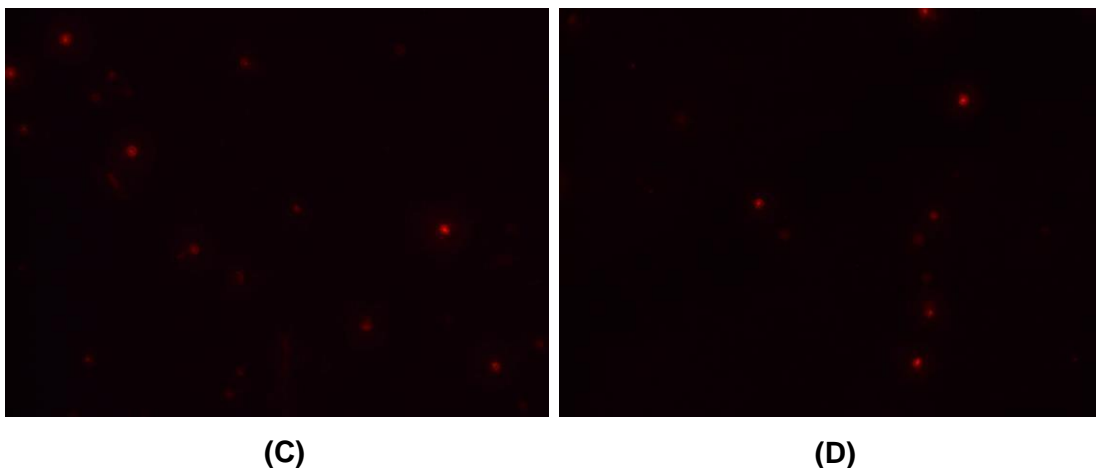
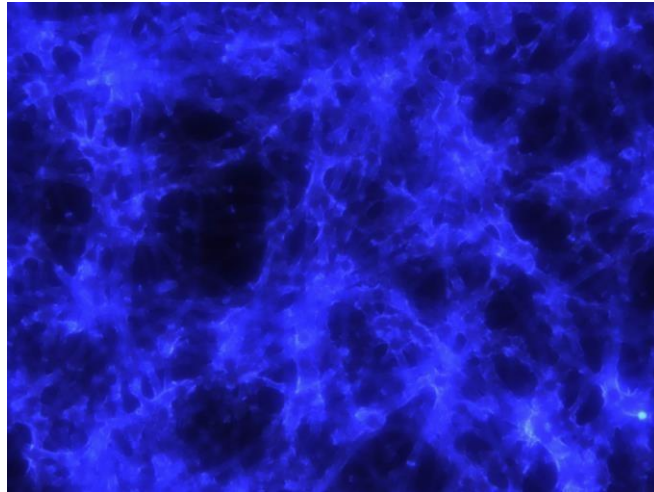


Figura 9. Esporas de *Aspergillus parasiticus* desarrolladas en medio adicionado con nanopartículas de quitosano (C) y nanopartículas del compuesto quitosano/lisozima (D), a las 24 horas, teñidas con solución de yoduro de propidio, a 40x.

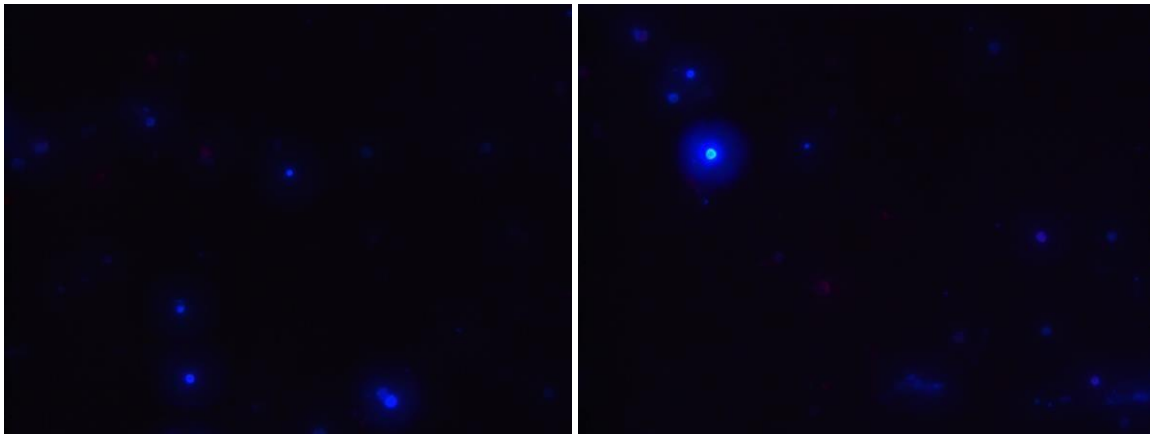
Blanco de Calcoflúor (BC)

Este colorante tiñe la quitina y glucanos, permitiendo visualizar la pared celular del hongo. En este trabajo, al observar las esporas e hifas desarrolladas en el medio control (Figura 10) se encontró que estaban teñidas, mostrando una coloración difusa en todo el campo debido al crecimiento de las hifas, lo cual no permitió distinguir claramente el organelo.

A diferencia del control, en los tratamientos con las nanopartículas de quitosano y las nanopartículas de quitosano-lisozima se encontraron algunas esporas en cuyas paredes celulares fue posible observar algunas vesículas teñidas (Figura 10), indicando la presencia de glucanos y quitina. La presencia de estas vesículas no fue visible en todas las esporas, lo cual se puede relacionar con la baja actividad de enzimas glucanasas encontrada en este estudio (Tabla 8).



(A)



(B)

(C)

Figura 10. Micelio y esporas de *Aspergillus parasiticus* teñidas con solución de Blanco de Calcoflúor, observadas a las 24 horas de incubación en medio de cultivo control (A), medio adicionado con nanopartículas de quitosano (B) y medio con nanopartículas del compuesto quitosano/lisozima (C), a 40x.

Lo anterior sugiere que tanto las nanopartículas de quitosano como los biocompuestos de quitosano/lisozima afectan el metabolismo asociado a la síntesis de glucanos, afectando directamente la integridad y permeabilidad de la membrana y en consecuencia impidiendo la germinación del hongo.

Faloidina

La actina es la proteína intracelular más abundante en células eucariotas tales como *Aspergillus parasiticus*, pudiendo llegar a representar hasta el 10% del peso total de proteína. Pesa alrededor de 43 kDa y está conservada evolutivamente. Existe como un monómero globular llamado actina G (actina globular) y como polímero filamentoso, actina F (actina filamentosa) (Tovar, 2004), los cuales están presentes en el hongo.

La actina G es una molécula asimétrica con un peso molecular de 42 kDa, que consta de dos dominios. Al aumentar la fuerza iónica se agrega de manera reversible y forma la actina F, un homopolímero helicoidal. La actina G contiene una molécula de ATP firmemente unida, que en la actina F se hidroliza con lentitud hasta ADP. De este modo la actina también posee propiedades enzimáticas (actividad de *ATPasa*) (Koolman y Rohm, 2004).

Debido a que las moléculas individuales de la actina G siempre están dispuestas en la misma dirección, una al lado de la otra, la actina F presenta polaridad. Esta tiene dos extremos diferentes en los que la polimerización ocurre a distinta velocidad. Entonces, si los extremos no son estabilizados por proteínas específicas (como es en el caso del músculo), ante una concentración crítica de actina G el extremo (+) de la actina F, crece en forma continua mientras que el extremo (-) se empieza a degradar simultáneamente (Koolman y Rohm, 2004). Este proceso puede ser inhibido utilizando venenos de hongos, como es el caso de la toxina fúngica del hongo *Amanita phalloides*; esta inhibe la degradación uniéndose al extremo (-), por lo cual se adhiere a la actina F. Debido a esta unión los filamentos se estabilizan y por consiguiente dan una coloración rojiza detectable mediante fluorescencia.

En el presente estudio, el colorante faloidina logró adherirse a la superficie de la mayoría de las esporas inoculadas en el tratamiento con las nanopartículas con quitosano y las nanopartículas de quitosano-lisozima, lo cual permite deducir que la actina F se estabilizó por el colorante, permitiendo la observación de los filamentos presentes en las esporas (Figura 11).

Aunque a simple vista no se observaron diferencias notables entre ambos tratamientos, en las esporas inoculadas en presencia del bionanocomposito de quitosano-lisozima se detectó una mayor intensidad en la coloración de las esporas, lo que indica que hay un mayor efecto inhibitorio. Cabe mencionar que en este tratamiento se encontró un menor número de esporas por campo, a diferencia de las nanopartículas cargadas solamente con quitosano, por lo que se puede deducir que este tratamiento puede ocasionar un mayor daño *in vitro* en las esporas de *A. parasiticus*.

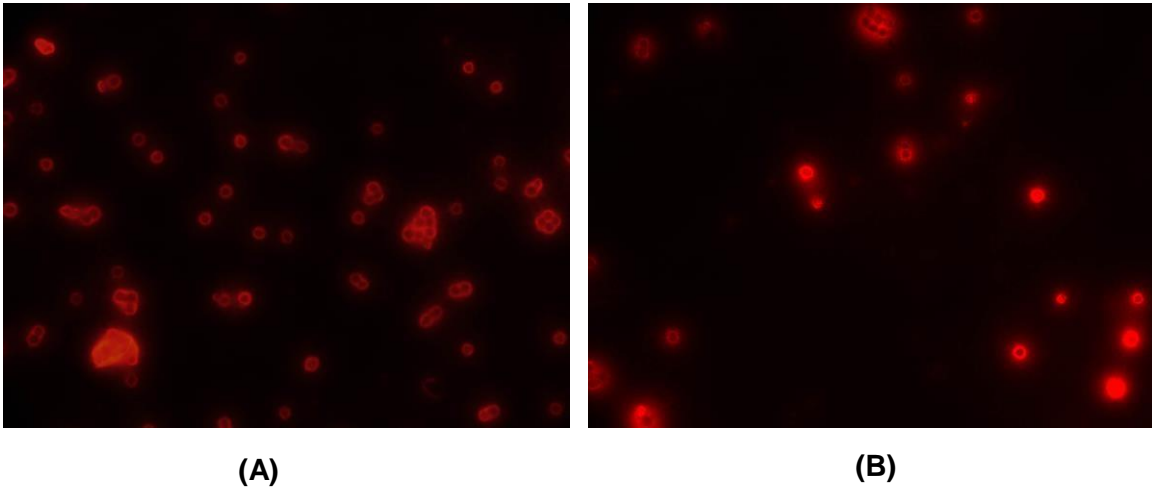


Figura 11. Esporas de *Aspergillus parasiticus* teñidas con solución de faloidina, observadas a las 24 horas de incubación en medio de cultivo adicionado con nanopartículas de quitosano (A) y medio con nanopartículas del compuesto quitosano/lisozima (B), a 40x.

CONCLUSIONES

Mediante la técnica de nanoprecipitación fue posible obtener nanopartículas de quitosano cargadas con lisozima, con un diámetro entre 11 y 15 nm.

Los bionanocompositos de quitosano-lisozima poseen una capacidad hidrolítica fuerte sobre el polisacárido β -1,3-glucano de la pared celular, el cual es el componente principal del hongo *Aspergillus parasiticus*. Es posible que estas afectaciones puedan llegar a involucrar otros componentes que se encuentran en menor medida, como la quitina.

La capacidad hidrolítica de los bionanocompositos induce un incremento en el diámetro promedio de las esporas, observando un hinchamiento de las mismas. Asimismo, inhiben fuertemente el proceso de germinación de esporas del hongo, encontrando 0% de esporas germinadas a las 24 horas.

En las esporas, tanto la pared celular como la membrana y algunos microfilamentos se vieron dañados o alterados por los bionanocompositos, afectando de esta forma el metabolismo del hongo.

Con base a lo anterior, las nanopartículas de quitosano-lisozima constituyen un método viable para el control de *Aspergillus parasiticus*, lo cual representa una alternativa natural al empleo de agentes químicos sintéticos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de un microscopio de barrido confocal a fin de poder observar, con una mayor resolución, cada uno de los organelos subcelulares que posee el hongo. De esta forma será posible evidenciar las zonas o estructuras más dañadas. Lo anterior repercutirá de manera positiva en el establecimiento de un posible mecanismo de acción por el cual actúen las nanopartículas de quitosano-lisozima.

Se recomienda llevar a cabo otros métodos de purificación para la extracción de los β -1,3-glucanos y a su vez de otros componentes de la pared celular como la quitina, para así poder tener un panorama más amplio con respecto al efecto inhibitorio que poseen dichos tratamientos.

Es importante evaluar el efecto de otros tipos de quitosano para la elaboración de las nanopartículas, ya que se ha demostrado que la sensibilidad de los microorganismos al quitosano varía en función del peso molecular.

Es importante también realizar ensayos para evaluar la toxicidad de los bionanocompositos, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Ello permitirá conocer la bioseguridad de estos materiales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca ML. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, pp. 79-84.
- Alcalá L., Muñoz P., Peláez T. & Bouza E. (2008). *Aspergillus* y aspergilosis. Control Calidad SEIMC, p. 1.
- Agnihotri S., Mallikarjuna N. & Aminabhavi T. (2004). Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. *J Controlled Release*, p. 5.
- Aranda A., López F. & López L. (2016). Cell wall composition plays a key role on sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Journal of Basic Microbiology (Environment-Health-Techniques)*, De *Journal of International Studies*, p. 4.
- Argüelles W., Heras A., Acosta N., Galed G., Gallardo A., Miralles B., Peniche C. & Roman J. 2004. Caracterización de quitina y quitosano. En: quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. 1ra Ed. *Fondo editorial Pontificia Universidad Católica de Perú*, p 312.
- Avery AA. (2006). Organic pesticide use: what we know and don't know about use, toxicity, and environmental impacts, in "*Crop Protection Products for Organic Agriculture: Environmental, Health, and Efficacy Assessment*", ed. by Felsot AS and Racke KD. American Chemical Society, pp. 58–77.
- Ayala A., Colina M., Molina J., Vargas J., Rincón D., Medina J., Rosales L. & Cárdenas H. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis morelet* que produce la sigatoka negra que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15: 312-313.
- Bodnar M., Harmann J. & Borbely J. (2006). Synthesis and study of cross-linked chitosan-N-poly (ethylene glycol) nanoparticles. *Biomacromolecules*, p. 3031.
- Bowman SM, & Free SJ. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28: 799-808.
- Borovitskaya E. & Shur M. (2002). Quantum Dots. *World scientific* Israelachvili N., 1991. Intermolecular and surfaces forces. *Academic press*.
- Brigger I., Dubernet C. & Couvreur P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, p. 631.
- Buitimea C. (2012). Efecto de las Fracciones Antifúngicas de *Jacquinia macrocarpa* y *Baccharis glutinosa* sobre el β -1,3-glucanasa de *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*. pp. 3-106.

- Cegielsa-Radziejewska, R., Lesnierowski, G & Kijowski, J. (2009). Antibacterial activity of hen egg White lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur. Food Res. Technol.*, pp: 841-845.
- Cota O., Cortez M., Ezquerro J., Lizardi J., Burgos A., Robles R. & Plascencia M. (2013). Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate, *J. Polym. Environ. Society of Chemical Industry* p. 971.
- Des Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider Y. & Pr at V. 2006. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J. Control*, pp.1–2.
- Ecobichon D.J. (2001). Pesticide use in developing countries. *Toxicology*, p.:27–33.
- Garcia L., Ver stegui L. (2001). Determinación de Metabolitos Secundarios a Partir de una Cepa Nativa de *Aspergillus sp.* Aislada del Páramo de Tablazo. *Pontificia Universidad Javeriana.*, p. 72.
- Gómez C. (2014). Nanop rculas Poliméricas: Tecnología y Aplicaciones Farmacéuticas *Sociedad de Farmacología de Chile*, pp. 7-8.
- Goycoolea F., Remu an C. & Alonso M. (2012). Nanop rculas a base de polisacáridos: quitosano. Abril 2016, de Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela., Laboratorio de Biopolímeros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, México.
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/990/1024>
- Gutierrez C., 2006. Las nanop rculas: pequeñas estructuras con gran potencial  Por qué el interés en estos materiales?  Qu  aplicaciones tienen? *El ININ hoy*, pp. 24-26.
- Hernández B. (2004). Marguerite, Chitin and Chitosan: Properties and application, 2006. Sitio web: www.sciencedirect.com
- Hernández C., Plascencia M. & Cortez O. (2016). Chitosan-ased Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, Primera edición, pp. 315-334.
- Hernández H.,  guila E., Flores O., Viveros E. & Ramos E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camar n. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, p. 57.

- Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu MJ, Park S, Marr KA, & Perlin S. (2007). Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother*, pp. 1876-1878.
- Lárez C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances de química*, 1: 15-16.
- Lavertu M, Xia Z., Serrequei A., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M. & Gupta A. 2003. A validated ^1H NMR method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 1149-1150.
- Liu Y., Sun Y., Xu Y., Feng H., Fu S., Tang J., Liu W., Sun D., Jiang H. & Xu S. (2016). Preparation and evaluation of lysozyme-loaded nanoparticles coated with poly--glutamic acid and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59: 201.
- López L., Gutiérrez P., Bautista S., Jiménez L. & Zavaleta H. (2013). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy Atins' durante el almacenamiento. *Chapingo Serie Horticultura*, pp. 316-317.
- Luque A., Cortez M., Velázquez C., Acosta A., Santacruz H., Burgos A., Argüelles W. & Plascencia M. 2016. Enhanced Antifungal Effect of Chitosan/Pepper Tree (*Shinus molle*) Essential Oil Bionanocomposites on the Viability of *Aspergillus parasiticus* Spores. *Journal of Nanomaterials*. De Hindawi Publishing Corporation Base de datos, pp. 1-3.
- Mármol Z., Páez G., Rincón M., Araujo K., Aiello C., Chandler C. & Gutiérrez E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, Volumen 1, pp. 54-56
- Mohanpuria P., Rana N. & Kumar S. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Springer Science+Business Media*, 10: 508.
- Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P. & Aminabhavi, T.M. (2008) Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control Release*. 125: 193-209.
- Nieto C., & Orellana V. (2011). Aplicación del quitosano como promotor de floculación para disminuir la carga contaminante. (pp. 39-40).

- Ortea L.. (2002). Determinación de hongos filamentosos asociados a cráneos de colección del Instituto Alexander Von Humboldt, y evaluación in Vitro de sustancias biocidas para su control. *Pontificia Universidad Javeriana.*, p. 74.
- Park S., Marsh K. & Rhim J. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films, affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*, p. 194.
- Pellegrini, A., Schumacher, S., Sthepan, R. 2003. In vitro activity of various antimicrobial peptides developed from the bacterial domains of lysozyme and b-lactoglobulin with respect to *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. *Archiv. furebensmittel hygiene*. 2003, 54: 25-48.
- Pilla C., Paul W. & Sharma C. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, p. 641.
- Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bllich B. & Cesaro A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 219-220. 2016, Mayo 21, De *ELSEVIER* Base de datos.
- Sayari N., Sila A., Eddine B., Ben R., Ellouz S., Bougatef A. & Balti R. (2016). Chitin and chitosan from the orway lobster by-products:Antimicrobial and anti-proliferative activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volumen 87, pp. 163-164. 2016, Abril 04, De *ELSEVIER* Base de datos.
- Trujillo C. (2015). Biosistemas nanoparticulados de quitosano/aceite de pirul (*Shinus molle*): síntesis y evaluación de su actividad antifúngica sobre *Aspergillus parasiticus*. (pp. 28-29).
- Tsaih M., & Chen R. 1999. Molecular weight determination of 83% degree of deacetylation chitosan with non-Gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, p. 1905.
- Valenzuela C. & Arias J. (2012). Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 27: 33-35.
- Velez, J. M. 2010. Actividad antifúngica de quitosanos de difeentes peso molecular sobre el crecimiento in vitro e in vivo de *Aspergillus niger*. Sonora México: Tesis profesional, Universidad de Sonora (UNISON).

Yao K., Li J., Yao F. & Yin Y. 2012. Chitosan-based hydrogels Functions and Applications. CRC Press, p. 319.

Zhou HY and Chen XG, Biocompatibility and characteristics of hitosan/cellulose acetate microspheres for drug delivery. *Front Mater Sci China* **2**:417–425 (2008). Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT, 2012).. (2012). *Aspergillus spp.*, pp. 2-3.