



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

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

**Bionanocompositos de quitosano con lisozima:
toxicidad y actividad antifúngica**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Cynthia Nazareth Hernández Téllez

Hermosillo, Sonora

Febrero 2018

APROBACIÓN

Bionanocompositos de quitosano con lisozima: citotoxicidad y actividad antifúngica

M.C. Cynthia Nazareth Hernández Téllez

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Directora de tesis

Dr. Armando Burgos Hernández
Miembro del comité de tesis

Dr. Mario Onofre Cortez Rocha
Miembro del comité de tesis

Dra. Judith Tánori Córdova
Miembro del comité de tesis

Dra. María del Carmen González Castillo
Miembro del comité de tesis

Hermosillo, Sonora

Febrero 2018

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención de grado de **Doctor en Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Sonora**.

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

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

Atentamente

M.C. Cynthia Nazareth Hernández Téllez

Dr. Enrique Márquez Ríos

Coordinador del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Febrero 2018

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por la beca económica otorgada y al apoyo recibido a través del proyecto número 219786, aprobado en la Convocatoria de investigación Científica Básica 201-2014, para la realización de mis estudios de doctorado.

A la **Universidad de Sonora**, por la oportunidad de aprender y desarrollar mis habilidades en esta alma máter, en especial al **Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos** por todos los años que fue mi primer hogar.

A mi comité de tesis, **Dra. Maribel Plascencia, Dr. Mario Cortez Rocha, Dr. Armando Burgos, Dra. Judith Tánori y Dra. María del Carmen González**, muchísimas gracias por su valioso tiempo dedicado a la realización de este trabajo, por sus sabios consejos, recomendaciones y observaciones siempre pertinentes.

A mis **amigos, compañeros y maestros** del laboratorio, por su apoyo académico siempre, por esos momentos y **convivios** inolvidables. Por los kilos demás adquiridos durante los 4 años que reflejan las mal pasadas, desveladas, y también la buena vida y muy buena compañía...*por ocupar un lugar en mi corazón ¡Gracias!*

A nuestra única e irremplazable **Coty**, por guiarnos y acarrearnos durante esta travesía, por siempre estar al pendiente de nosotros. Al jefe de carrera, a nuestro coordinador, a Gabriel a Chuy y a todo el personal que facilita nuestra estancia.

Y como olvidar el **incidente** (incendio) que agrega una experiencia única en este departamento, permitiéndome apoyar con mi granito de arena a mi alma máter.

¡Siempre búho de corazón!

DEDICATORIA

A mi familia...

por siempre estar a mi lado para apoyarme en todo, a mi hermana **Carol** y mi hermano **Carlos**, por ser grandes amigos y confidentes, por sus gracias, chistes y calidez de familia, por darme tanta paz.

A mi madre **Patricia** por ser mi mayor ejemplo a seguir, porque por ti soy en lo que hoy me convierto, en tu reflejo forjo mi futuro...

A mi esposo **Julio Manuel**, por tu siempre incondicional ayuda, por ser mi apoyo en toda situación, por confiar en mí, por tus traducciones de un día para otro y por todas las necesidades técnicas solucionadas.

For being always my little "pig".

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	i
DERECHOS DE AUTOR.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
CONTENIDO.....	v
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Qitosano.....	4
Toxicidad.....	5
Actividad Antimicrobiana.....	5
Bionanocompositos de Qitosano.....	7
Métodos de Obtención de Materiales Nanoestructurados a Base de Qitosano.....	8
Precipitación de emulsión-goteo.....	8
Entrecruzamiento.....	8
Secado por pulverización.....	9
Gelificación iónica.....	9
Nanoprecipitación.....	10
Complejación iónica.....	10
Toxicidad de Sistemas Nanoparticulados.....	11
Sistemas Nanoparticulados de Qitosano con Compuestos Bioactivos.....	13
Lisozima y su Actividad Antimicrobiana.....	15
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos particulares.....	19
DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	20

Primera Etapa.....	20
Segunda Etapa.....	20
Descripción del Capítulo 1.....	20
Descripción del Capítulo 2.....	21
Descripción del Capítulo 3.....	21
CAPÍTULO 1.....	22
CAPÍTULO 2.....	48
CAPÍTULO 3.....	62
CONCLUSIONES.....	79
RECOMENDACIONES.....	80
PRODUCTOS.....	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

RESUMEN

El uso de partículas poliméricas especialmente elaboradas con polímeros naturales, ha ganado gran interés en investigación para el desarrollo de nuevas tecnologías en la industria alimentaria. En este estudio se elaboraron partículas de quitosano (Cs) y quitosano-lisozima (CS-LZ) por el método de nanoprecipitación, y de quitosano-carragenina (CS-Crg) y quitosano-carragenina-lisozima (CS-Crg-LZ) por el método de complejación iónica. El objetivo fue analizar la actividad antimicrobiana de partículas elaboradas sobre *Aspergillus parasiticus*, caracterizarlas fisicoquímicamente y determinar su citotoxicidad. Las partículas se analizaron por Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) y Dispersión de Luz Dinámica (DLS) para visualizar su forma, dispersión de tamaño y potencial Z. Se realizó un análisis del porcentaje de asociación de la lisozima por MicroBCA y la actividad biológica se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular por XTT en esporas de *Aspergillus parasiticus* y el ensayo de citotoxicidad por MTT en células ARPE-19. El efecto sobre las estructuras subcelulares de células ARPE-19 se determinó mediante fluorescencia con biomarcadores DAPI y faloidina, además se realizó un ensayo de Ames para evaluar la mutagenicidad. El análisis de MFA evidenció la formación de partículas semiovaladas con un tamaño aproximado de 400 y 280 nm para CS-Crg y CS-Crg-LZ, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por DLS, en donde se observaron tamaños de 725 ± 5.5 y 250 ± 8.1 nm para CS-Crg y CS-Crg-LZ, respectivamente. Estos materiales presentaron un potencial Z que osciló entre 28.7 ± 1.0 y 21.6 ± 0.8 mV, respectivamente. Al evaluar la actividad antifúngica se encontró que las partículas de CS-Crg presentaron un mayor efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las esporas de *A. parasiticus* (50%) a una concentración de 350 $\mu\text{g/mL}$, en comparación con las partículas de CS-LZ. El análisis de citotoxicidad por MTT mostró que ninguna de las partículas causó un efecto adverso en la viabilidad de las células ARPE, encontrando una proliferación celular del 100% en todas las concentraciones probadas (50-400 $\mu\text{g/mL}$). Asimismo, no se evidenciaron cambios y/o afectaciones en la morfología celular con

respecto al control, a las 48 h, observándose estructuras normales en el citoesqueleto de actina y en la estructura de ADN. Además el ensayo de Ames reveló que las partículas no presentan potencial mutagénico. Estos ensayos demuestran que las partículas a base de quitosano constituyen una opción factible y segura para el control de hongos patogénicos de interés agrícola-alimentario.

INTRODUCCIÓN

Los materiales elaborados a escala micro y nanométrica constituyen un nanoproducto de creciente importancia y su uso ha sido muy significativo en las últimas décadas. A la fecha se han desarrollado diferentes sistemas nanoparticulados con distintas aplicaciones en el área industrial y empaque de alimentos, siendo en particular una importante herramienta en el área biomédica. Los nanomateriales se han utilizado como terapias para el tratamiento de diferentes enfermedades, como vehículos para la liberación controlada de fármacos y en ingeniería biomédica, entre otras (Hernández-Téllez, Plascencia-Jatomea, & Cortez-Rocha, 2016).

El uso y desarrollo de estos nanocompuestos se encuentra en pleno auge. En este contexto, debido a la competencia y progreso de diferentes mercados, se ha vuelto necesario que las compañías investiguen nuevas maneras de mejorar su productividad en términos de seguridad, uso de empaques de manera sostenible e implementación de tecnología flexible y estandarizada. Recientes avances en el área de la nanotecnología le han proporcionado a las grandes compañías oportunidades de reacomodar sus esquemas de proceso, empaque y manufactura (Camacho Elizondo, Vega Baudrit, & Campos Gallo, 2011). Esta tecnología tiene aplicaciones potenciales en diversas áreas y permite el desarrollo de productos novedosos en la industria de alimentos, medicina, farmacéutica, entre otras.

El desarrollo y estudio de nanocompositos elaborados a partir de polímeros naturales (biocompositos) con compuestos bioactivos es un área de desarrollo de la nanotecnología. Debido a su biocompatibilidad, actividad biológica y biodegradabilidad, estos nanocompositos tienen importantes aplicaciones en medicina y farmacéutica. En general, los polímeros naturales más utilizados para la elaboración de nanopartículas (NP's) son el ácido poliláctico, celulosa, almidón, proteínas y quitosano. A partir de estos se han elaborado diversos sistemas nanoparticulados cuyo estudio se ha enfocado principalmente en la eficiencia de encapsulación del

compuesto activo (Deng, Zhou, & Luo, 2006), capacidad de cargado (Piras et al., 2014), tasa de liberación (Derakhshandeh & Fathi, 2012) y análisis físicos (Cai, Bakowsky, Rytting, Schaper, & Kissel, 2008). Sin embargo, existe escasa o nula información que documente acerca de la toxicidad y seguridad de estas NP's en sistemas biológicos.

Las NP's presentan características particulares que pueden ser contraproducentes cuando son expuestas a organismos vivos como el ser humano, animales y plantas. Tienen la capacidad de atravesar membranas celulares como la hematoencefálica y presentan un área de superficie amplia y una alta capacidad de reacción, lo que se atribuye a su tamaño nanométrico. Debido a estas características intrínsecas, las NP's pueden presentar una actividad tóxica en un organismo, así como el daño celular causado por una acumulación en tejidos cuando un organismo es expuesto a una dosis determinada, aún cuando son elaboradas a partir de compuestos naturales (Cota-Arriola et al., 2013; Hernández-Téllez et al., 2016).

Se han realizado diversos estudios orientados a la aplicación de estos materiales en medicina para humanos y se les ha asociado con propiedades como actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antidiabética y efecto reductor de colesterol (Durango et al., 2006; Hirano, Yamaguchi, Fukui, & Iwata, 1990; Lin et al., 2007; Muzzarelli et al., 1989; Park, Je, Byun, Moon, & Kim, 2004). La aplicación en ingeniería médica ha sido de gran interés ya que su biocompatibilidad permite el uso biopolímeros como el quitosano en la reconstrucción de tejidos musculares y óseos en el humano; además, se ha documentado la capacidad proliferativa de éste tipo de células en estos materiales biopoliméricos, promoviendo la regeneración de tejidos dañados (Muzzarelli et al., 1989).

Debido a esta gran aplicación industrial y en particular biomédica, es muy importante el estudio de los bionanocompositos ya que representan una tecnología de alto nivel con resultados prometedores. El utilizar compuestos de base biológica aumenta aún más su potencial uso en aplicaciones versátiles, además de poseer una gran

funcionalidad. Aunado a lo anterior, es de gran interés demostrar que el uso de estos bionanocompositos es seguro para su utilización y que no poseen efectos adversos a la salud humana.

La investigación en nanotecnología se encuentra en pleno auge. Se han desarrollado diferentes nanoprodutos y sistemas aplicados a una vasta gama de disciplinas. Hoy en día existe una amplia aplicación y demanda de nanocompuestos principalmente en las áreas de farmacología y biomedicina, donde se utilizan como vectores de compuestos bioactivos para su posterior liberación; además, en el área de alimentos se ha probado su uso como aditivos y en empaques para conservar y extender la vida de anaquel de los mismos. Debido a esto, es importante promover el estudio de los nanocompuestos con relación a su citotoxicidad, ya que, dadas las características intrínsecas antimicrobianas del quitosano, es posible elaborar NP's de este biopolímero y utilizarlas contra microorganismos patógenos sin afectar la biota. La adición de péptidos antimicrobianos como la lisozima a las NP's de quitosano constituye una vía prometedora para maximizar este efecto contra hongos filamentosos productores de toxinas y dirigirlo hacia un área que aún no es explorada, tal como la aplicación en agricultura y productos postcosecha.

ANTECEDENTES

Quitosano

El quitosano (CS) es un polisacárido cristalino conformado estructuralmente por residuos de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que se obtiene mediante la desacetilación parcial, vía química o enzimática, de la quitina, la cual es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa. El grado de desacetilación (DD) del CS normalmente oscila entre el 70 y el 95%, siendo considerado como tal a partir de un DD del 60%. La principal fuente de polímeros quitinosos es el caparazón de los crustáceos, aunque también se le encuentra formando parte de la pluma de calamar, la cutícula de insectos y la pared celular de algunos hongos (Kim, 2010).

A diferencia de la quitina, el grupo amino del CS permite que el polímero sea soluble en ácidos orgánicos diluidos y el grado de desacetilación determina el número de grupos amino presentes en el polisacárido, lo cual influye en su funcionalidad (Kim, 2010). El CS posee propiedades interesantes como biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja o nula toxicidad y propiedades fisicoquímicas versátiles que lo vuelven muy interesante para una amplia variedad de aplicaciones en diferentes áreas como en alimentos (Camacho Elizondo et al., 2011), cosmetología (Kumar, 2000), biomedicina (Felt, Buri, & Gurny, 1998), agricultura (Cota-Arriola et al., 2013) y tratamiento de aguas residuales (Li et al., 2008). Una aplicación novedosa es el diseño de materiales funcionales y biodegradables, lo que constituye una alternativa prometedora al uso de materiales poliméricos sintéticos no degradables, líderes en la contaminación ambiental (Rogovina, Alexanyan, & Prut, 2011).

Por lo anterior, es importante el desarrollo y estudio de materiales biodegradables con potenciales aplicaciones en alimentos para su preservación (De Azeredo, 2009), así como en agricultura para la liberación de compuestos bioactivos, un área de aplicación poco estudiada.

Toxicidad

El CS ha sido ampliamente estudiado durante las últimas dos décadas, atrayendo la atención de investigadores y científicos debido a sus interesantes propiedades y versatilidad. Se le puede encontrar en distintas formas y tamaños, puede variar en cuanto a su grado de desacetilación (DD) y peso molecular (PM), del cual dependerá su actividad biológica y toxicidad.

Normalmente, en un sistema de liberación controlada el CS funciona como el excipiente acarreador del compuesto activo y posterior al consumo de este se debe dar seguimiento a su internalización, distribución y posible toxicidad. Se ha reportado que, en los vertebrados, el CS es degradado a nivel del colon bajo la acción de diferentes enzimas como lisozima y enzimas bacteriales, principalmente. No obstante, se han identificado tres enzimas quitinasas humanas capaces de degradar al biopolímero.

En general, algunas especies de microorganismos sintetizan y/o degradan quitina, el precursor natural del CS; las quitinasas de estos microorganismos hidrolizan las uniones N-acetil- β -1,4-glucosamina al azar y algunos autores han reportado que la velocidad de biodegradabilidad en organismos vivos depende del DD; si incrementa el DD, disminuye la velocidad de degradación (Elgadir et al., 2015; Kean & Thanou, 2010).

Actividad Antimicrobiana

El CS presenta actividad frente a determinados microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, entre otros (Kurita, 2006; Muzzarelli et al., 1990). Esta actividad antimicrobiana se asocia principalmente a la interacción entre los grupos amino protonados del CS y las cargas negativas de las paredes celulares de los microorganismos, que dan lugar a cambios en la permeabilidad de membrana. También se ha reportado una inhibición de la síntesis

de ARNm y proteínas debido a la unión del CS al ADN (Chung & Chen, 2008; Sudarshan, Hoover, & Knorr, 1992), sin embargo, este mecanismo se asocia a CS de muy bajo peso molecular o bien a quitooligómeros. Asimismo, el biopolímero es capaz de inhibir el crecimiento de una gran variedad de levaduras y hongos, algunos de los cuales producen micotoxinas contaminantes durante el almacenamiento de productos agrícolas, provocando grandes pérdidas económicas en el mundo (alrededor del 25%) (Plascencia-Jatomea, Yépiz-Gómez, & Velez-Haro, 2014).

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* son los principales contaminantes de productos como el maíz, maní, algodón, frutos secos, arroz, tabaco y especias, caracterizándose por producir aflatoxinas, compuestos poliacéticos naturales. La aflatoxina B1 (AFB1) es la más importante debido a su alta toxicidad para humanos y animales y, dependiendo de la duración y nivel de exposición, son hepatotóxicas y cancerígenas (Cota-Arriola et al., 2011). Con base a lo anterior, el uso de sustancias bioactivas naturales para el control de infecciones ocasionadas por el desarrollo de hongos toxigénicos ha atraído la atención debido al impacto negativo derivado del uso de agentes químicos, los cuales producen contaminación ambiental, generan residuos en productos alimenticios y se les ha asociado con el desarrollo de hongos resistentes a tratamientos químicos.

Con relación al estudio del efecto del CS sobre el crecimiento de microorganismos, se han desarrollado sistemas biopoliméricos con compuestos bioactivos para combatir afectaciones de origen microbiano en diversos productos y alimentos postcosecha. Estudios previos han demostrado la actividad antimicrobiana que exhiben los sistemas nanoparticulados elaborados a base de formulaciones con CS (Chávez-Magdaleno et al., 2017; Hernández-Téllez et al., 2017; Luque-Alcaraz et al., 2016), no obstante, también se ha demostrado que la exposición prolongada a este y otros tipos de NP's puede conducir a una toxicidad (Hsu et al., 2011).

Al evaluar la actividad antifúngica del CS contra *Aspergillus parasiticus* se encontró que concentraciones de 6.71 y 10.66 g L⁻¹ (CI₅₀) son efectivas para retrasar el

crecimiento radial en un 50% a las 122 h y la germinación de esporas en >50% a las 8 h, respectivamente. Sin embargo, aunque el CS disminuyó ($P \leq 0.05$) la producción de aflatoxina B1 a los 8 d con respecto al control, se encontró un incremento ($P \leq 0.05$) en la producción total de aflatoxinas de *A. parasiticus* (Cota-Arriola et al., 2011). Estos resultados demuestran la actividad antimicrobiana y antimicotoxigénica que presenta el CS, así como su potencial para reducir la síntesis de AFB1.

Bionanocompositos de Quitosano

Los bionanocompositos se han reconocido como un sistema novedoso y muy utilizado; representan un grupo emergente de materiales híbridos nanoestructurados, formados por una combinación de polímeros naturales y sólidos inorgánicos que presentan al menos una dimensión en la escala nanométrica (Hernández-Téllez et al., 2017). Estos materiales híbridos exhiben un mejoramiento estructural y propiedades funcionales como alto rendimiento y bajo peso, características que son de gran interés para diferentes aplicaciones (Patel, Jammalamadaka, Sun, Tappa, & Mills, 2015). Las propiedades inherentes de los biopolímeros como su compatibilidad y biodegradabilidad abren nuevas perspectivas con especial incidencia en la industria alimentaria.

Los bionanocompositos forman parte de la nanotecnología, la cual involucra la habilidad para trabajar en una escala de 1-1000 nm dependiendo su aplicación, con el fin de entender, caracterizar y utilizar materiales, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades derivadas de nanoestructuras (De Azeredo, 2009). Se ha sugerido que las propiedades de los biomateriales de empaque pueden ser superadas por la tecnología de nanocompositos, ya que exhiben un incremento en las propiedades de barrera y fuerza mecánica, además de una mejora de la resistencia comparada a los polímeros convencionales (Arora & Padua, 2010). El desarrollo de compositos de base biológica y el uso de tecnologías innovadoras pueden reducir la dependencia de los

combustibles fósiles. Sin embargo, las nuevas propiedades fisicoquímicas de los materiales a nanoescala enfatizan la necesidad de evaluar adecuadamente los efectos y riesgos potenciales a la salud humana, específicamente en lo que concierne a la posible citotoxicidad. Aunque evidencias experimentales sugieren que las NP's pueden tener un efecto adverso en la salud humana, la relación entre el fundamento causa y efecto aún no es completamente entendida (Foldbjerg, Dang, & Autrup, 2011).

Métodos de Obtención de Materiales Nanoestructurados a Base de Quitosano

Los sistemas nanoparticulados de liberación controlada varían en su estructura y morfología. Pueden presentarse en forma de partículas, fibras, cápsulas, capas o en micelas, todas en su escala nano e incluso micrométrica. La forma final y funcionalidad puede variar en función del método de elaboración utilizado. Algunos de los métodos más comunes son los siguientes:

Complejación iónica

Este método se basa en las interacciones electrostáticas entre los grupos amino positivos del CS con los aniones (sulfatos) de la carragenina (Crg). La Crg es un polisacárido extraído de algas rojas y está compuesto por unidades de galactosa y anhidrogalactosa unidas mediante uniones glucosídicas. Dependiendo del tipo de alga y de extracción, tres tipos de Crg pueden obtenerse: kappa (k), iota (i) y lambda (λ), las cuales varían su estructura en el grado de sustitución de grupos sulfato y de ello dependerá el tipo de material a formar. Una ventaja de este método es que evita el uso de solventes orgánicos y residuos, los cuales pueden interferir con la integridad del compuesto activo. Asimismo, las interacciones en las partículas pueden ser reversibles por cambios en la fuerza iónica, pH y temperatura. La síntesis se realiza en condiciones completamente hidrofílicas. La solución de Crg se gotea a la solución de CS con el compuesto activo bajo agitación, donde un cambio de turbidez o color en la suspensión indica la formación de las partículas (Grenha et al., 2010).

La selección del método más adecuado dependerá del producto final y de los objetivos particulares requeridos, así como del tamaño de partícula, estabilidad térmica, tiempo de liberación del compuesto activo y toxicidad final del producto. La liberación del compuesto bioactivo a partir de sistemas de partículas dependerá de la densidad de la matriz del polímero (Cota-Arriola et al., 2013a).

Nanoprecipitación

Este método presenta numerosas ventajas, es una técnica sencilla, rápida y fácil de realizar. La formación de las NP's es instantánea y el procedimiento se realiza en un solo paso. Se requiere usar dos disolventes miscibles, el primero debe disolver tanto al polímero a utilizar como el fármaco (disolvente), mientras que el segundo debe ser no soluble para ambos (no disolvente). La nanoprecipitación ocurre cuando el polímero en solución entra en contacto con el no disolvente, llevándose a cabo un desplazamiento de solvente y las cadenas del polímero comienzan a plegarse y el compuesto activo queda atrapado en las NP's. El efecto que predomina en este proceso se denomina Marangoni, que es la transferencia de masa entre dos fases turbulentas causadas por el disolvente y no disolvente. Algunos de los fenómenos complejos que intervienen en este sistema de precipitación son el flujo, la difusión y las variaciones en la tensión superficial. Además del CS también se han utilizado otros tipos de polímeros para la formación de sistemas nanoparticulados mediante esta técnica (Agnihotri et al., 2004; Bilati, Allémann, & Doelker, 2005; Cota-Arriola et al., 2013a).

Precipitación de emulsión-goteo

El método de la coalescencia de gotas de emulsión utiliza los principios de emulsión, reticulación y precipitación. La precipitación se induce por permitir la coalescencia de pequeñas gotas de CS con gotas de NaOH. Una emulsión estable que contiene solución acuosa de CS mezclada con el compuesto activo se produce en aceite de parafina líquida; después, otra emulsión que contiene solución acuosa de NaOH se

produce de la misma manera. Cuando ambas emulsiones se mezclan a alta velocidad de agitación, las gotitas de cada emulsión pueden colisionar al azar y fusionarse, precipitando gotas de CS para dar lugar a partículas de tamaño pequeño (Cota-Arriola et al., 2013a).

Entrecruzamiento

Este método involucra el entrecruzamiento o reticulación de grupos amino del CS con grupos aldehídos de un agente entrecruzante. Se prepara una emulsión de agua en aceite y se estabiliza con un surfactante. Después, la emulsión se combina con el agente entrecruzante (generalmente glutaraldehído) para formar esferas, mismas que son filtradas y lavadas con n-hexano o alcohol seco. El tamaño de partícula se controla por el tamaño de goteo de la emulsión que interactúa con el medio reticulador, el grado de reticulación y la velocidad de agitación. El método tiene sus inconveniencias, es tedioso y puede generar reacciones químicas con el agente activo. Los parámetros que afectan la preparación y rendimiento de las esferas son el peso molecular, la concentración de CS así como el tipo y concentración de surfactante utilizado (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004).

Secado por pulverización

Es una técnica conocida para producir polvos, gránulos o aglomerados de la mezcla de soluciones de fármacos, excipientes y suspensiones. El método se basa en el secado de gotas atomizadas en una corriente de aire caliente. El CS se disuelve en ácido acético en la que se disuelve el fármaco y después se añade un agente entrecruzante adecuado. Esta solución o dispersión se atomiza en una corriente de aire caliente, lo cual conduce a la formación de pequeñas gotas de disolvente; este se evapora instantáneamente y forma las partículas que fluyen de forma libre. El tamaño de partícula dependerá del tamaño de la boquilla, velocidad de flujo de pulverización, presión de atomización, temperatura del aire de entrada y la extensión de reticulación (Agnihotri et al., 2004).

Gelificación iónica

Se han aplicado interacciones electrostáticas por entrecruzamiento físico reversible en lugar de reticulación química, para evitar la posible toxicidad de los reactivos y otros efectos indeseables. El tripolifosfato (TPP) es un polianión que puede interactuar con el CS catiónico por fuerzas electrostáticas. En el método de gelificación iónica, el CS se disuelve en solución ácida acuosa para obtener el CS catión y esta solución se añade gota a gota con agitación constante a la disolución de TPP polianiónico. Debido a la complejidad entre especies cargadas opuestamente, el CS se somete a gelificación iónica y precipita para formar partículas esféricas. Sin embargo, las partículas formadas por TPP/quitosano tienen una fuerza mecánica pobre, lo que limita su uso en la liberación de compuestos activos (Agnihotri et al., 2004; Cota-Arriola et al., 2013a).

Toxicidad de Sistemas Nanoparticulados

Las NP's poseen composición química, tamaño, forma, solubilidad, carga eléctrica y estructura superficial que les permite atravesar las membranas fácilmente o unirse a compuestos orgánicos. Debido a esto, la acción tóxica de las NP's es superior en comparación a partículas de mayor tamaño, incluso elaboradas a partir de los mismos compuestos. Una dosis de un fármaco encapsulado en NP's puede conllevar a la aparición de efectos secundarios más graves que la misma dosis en una formulación común (Mateo, Morales, Ávalos, & Haza, 2013), siendo el tamaño más eficaz para una formulación de NP's entre 50 y 200 nm. Entre los efectos más tóxicos y usuales que producen está la muerte celular por apoptosis y la inflamación, producida por dosis prolongadas debido a la acumulación de metales o fármacos, ya sea dentro de la célula o por fagocitosis (Mateo et al., 2013). Algunos autores han planteado posibles efectos citotóxicos relacionados con el tipo de sal y el peso molecular del polímero (Carreno-Gomez & Duncan, 1997; Chae, Son, Lee, Jang, & Nah, 2005; Opanasopit et al., 2007).

Existen múltiples factores que participan en la guía de las rutas de internalización celular y la focalización de los principales modos de captación, endocitosis y el cruce directo de la membrana plasmática (translocación) (Mateo et al., 2013; Pae et al., 2014). Con la reducción de las partículas de una sustancia se aumenta la superficie específica y por tanto su potencial reactivo, que en algunos casos puede conducir a la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Maurer-Jones, Lin, & Haynes, 2010).

Últimamente existe un gran interés en utilizar materiales naturales que sirvan como base para la elaboración de sistemas nanoparticulados, siendo los más utilizados los biopolímeros como el almidón, celulosa y sus derivados, ácido poliláctico y CS. Sin embargo, también se manejan NP's de origen metálico, principalmente de plata y oro. Las NP's con sales de oro se han utilizado en la investigación como agentes antitumorales; debido a la vascularización en éstas células, las partículas con un tamaño de alrededor de 130 nm son capaces de atravesar los vasos cuando en el resto de los tejidos sanos tendrían problemas para lograrlo (Mateo et al., 2013).

En un estudio realizado para el tratamiento de heridas en ratas se encontró que las NP's de CS con Au y Ag promueven la reparación de las heridas de la piel y hemostasis, así como una eficiencia antiinflamatoria muy efectiva. Sin embargo, estos datos demostraron que la liberación de iones al medio fue insignificante en corto tiempo, aunque la liberación en un período de tiempo más extenso *in vivo* podría ser significativa y conducir a una toxicidad. Además, las NP's de CS con Ag en una concentración de 120 ppm también presentan efecto antibacterial contra *Staphylococcus aureus* (Hsu et al., 2011). Con relación a las propiedades fisicoquímicas, se observó que pequeñas cantidades de NP's de Ag pueden inducir cambios significantes en las propiedades fisicoquímicas del CS, tales como una buena dispersión y homogeneidad en la matriz elaborada y el aumento de dominios nanocristalinos, lo cual puede incrementar su biocompatibilidad y potencial en el tratamiento de heridas (Hsu et al., 2011).

NP's de CS formuladas con TPP, con tamaños entre 80 y 20 nm, presentaron un mayor efecto antifúngico contra *Aspergillus parasiticus* en comparación con CS en solución, ocasionando cambios morfológicos tanto en las hifas como en las esporas del hongo. De acuerdo a estos autores, el tamaño de las partículas y la disponibilidad de los grupos funcionales de CS/TPP (grupo amino y fosfato, respectivamente) sugieren un posible efecto sinérgico entre el CS y el TPP (Cota-Arriola et al., 2013b).

En general, las NP's tienen propiedades particulares que pueden ser aprovechadas; sin embargo, se ha documentado que la forma, tamaño y naturaleza en la que se suministra un material a un organismo es crucial para su eliminación. Por ello, es importante determinar si las NP's de CS pueden presentar un riesgo y bioacumulación en los organismos vivos.

Sistemas Nanoparticulados de Quitosano con Compuestos Bioactivos

En los últimos años se ha incrementado el interés en desarrollar matrices formuladas a base de polímeros naturales, que resultan en un sistema de liberación controlada que provee una dosificación continua de compuestos funcionales. No obstante, el desarrollo de la versatilidad y la gran capacidad de respuesta de los sistemas de liberación siguen constituyendo un reto (Pinheiro et al., 2012). Los recubrimientos con nanocapas tienen aplicaciones muy prometedoras incluyendo la industria farmacéutica, biomedicina y empaques de alimentos. La liberación de compuestos bioactivos de estos materiales puede ocurrir por mecanismos de difusión, hinchazón de la matriz polimérica, erosión del polímero y degradación, los cuales pueden prevalecer dependiendo del sistema y de las condiciones ambientales. Por ejemplo, la liberación y transporte del compuesto catiónico azul de metileno incorporado en diferentes posiciones de nanocapas de CS está asociada al gradiente de concentración y a la relajación de las nanocapas compuestas de CS y k-carragenina,

siendo dependiente de la temperatura, pH del medio y de la posición de la molécula del colorante azul de metileno (Pinheiro et al., 2012). De igual forma, el CS también se ha empleado en la elaboración de nanocompuestos con nobiletina, un flavonoide con alta actividad antiproliferativa presente en las frutas. En este estudio, la actividad antiproliferativa de las NP's cargadas exhibió una inhibición ($IC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$) considerable de células cancerosas, revelando su gran potencial para aplicaciones en quimioterapias de cáncer. Los autores propusieron la formación de un enlace imino entre los grupos amino del CS y el grupo carbonilo de la nobiletina vía base-Schiff (Luque-Alcaraz et al., 2012).

Por otra parte, NP's de CS cargadas con lisozima, elaboradas por gelación iónica y con tamaño de 150 nm de diámetro, presentaron una actividad antibacteriana efectiva de la enzima contra *Staphylococcus epidermidis*, manteniéndose una liberación que se prolongó durante 3 semanas *in vitro*. Además, las NP's mostraron una citocompatibilidad completa en ensayos *in vitro* con fibroblastos murinos (Piras et al., 2014). En un estudio similar, al evaluar la liberación de albúmina sérica bovina (BSA) cargada en NP's de CS, se encontró que los factores que afectan las propiedades de liberación de la BSA fueron el peso molecular y el grado de desacetilación del CS, además de la concentración inicial de BSA y la presencia de polietilenglicol (PEG) en el medio de encapsulación. Al aumentar el peso molecular del CS de 10 a 210 kDa, la eficiencia de encapsulación se mejoró dos veces y la liberación de BSA en medio PBS (pH 7.4) se redujo de 73.9 a 17.6% a los 8 días. El incremento del grado de desacetilación de 75.5 a 92% promovió la eficiencia de encapsulación y desaceleró la velocidad de liberación, mientras que la adición de PEG afectó de manera negativa la encapsulación de BSA y aceleró la velocidad de liberación. Los autores concluyeron que los parámetros moleculares y de formación de NP's de CS tienen un rol importante en la liberación de la proteína, siendo posible modular parámetros relativos para satisfacer las necesidades de entrega de proteína (Xu & Du, 2003).

Deng y col. (2006) sintetizaron NP's de CS cargadas con lisozima por gelación iónica, observando tamaños entre 50-280 nm de diámetro. Los autores analizaron el efecto

del peso molecular del CS y el contenido inicial de CS, TPP y lisozima sobre la eficiencia de encapsulación (EE), capacidad de cargado (CC), tasa de liberación y actividad de la lisozima en las NP's de CS (Deng et al., 2006). Ellos encontraron que todos los parámetros tienen un gran efecto sobre la eficiencia de encapsulación, no obstante, encontraron un bajo efecto en la capacidad de cargado, ya que a mayor peso molecular del CS se obtiene una mayor EE y CC de la lisozima, aunque una menor tasa de liberación. Por otra parte, estos parámetros disminuyeron al incrementar la cantidad de CS, concluyendo que estos pueden ser modificados según las necesidades de liberación de la proteína.

Los estudios relacionados con el desarrollo de NP's de CS cargadas con compuestos bioactivos dirigidos al área de farmacología, básicamente se han enfocado hacia la utilización de matrices de CS para la liberación controlada del compuesto activo, determinando principalmente su tasa de entrega o liberación. Si bien es cierto que poseen un gran potencial en esta área, existe escasa información asociada a la citotoxicidad de estos nanocompuestos y de su efecto *in vivo* e *in vitro* en hongos fitopatógenos productores de toxinas de importancia agrícola.

Lisozima y su Actividad Antimicrobiana

La lisozima, también llamada muramidasa, es una enzima con un peso molecular de 14.4 kDa (E.C.3.2.1.17) que fue descubierta por Alexander Fleming en 1922. Esta enzima cataliza la hidrólisis de las uniones β -1, 4 entre los residuos de ácido N-acetil murámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano. Es una proteína de 129 aminoácidos, presenta un pH óptimo en el rango de 6-9, un punto isoeléctrico cercano al 9.2 y posee actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral e inmunomoduladora (Carrillo, 2013). En el humano es abundante en la saliva, las lágrimas y el moco, también está presente en pulmones, bazo, leucocitos, leche, plasma y cartílago y actúa como mecanismo de defensa frente a infecciones (Lesnierowski, Kijowski, &

Cegielska-Radziejewska, 2009). Así mismo se encuentra en organismos como insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, incluyendo los huevos de las aves, siendo esta última la fuente para su producción industrial. Se ha utilizado como modelo enzimático, en química de proteínas, cristalografía, resonancia magnética nuclear (NMR), entre otros (Jollès & Jollès, 1984). Presenta 19 aminoácidos cargados positivamente en su cadena peptídica, por lo cual es una proteína de carácter altamente catiónico, cuenta con 8 cisteínas las cuales dan lugar a 4 puentes disulfuro (You, Udenigwe, Aluko, & Wu, 2010).

La lisozima presenta actividad antibacteriana particularmente contra bacterias Gram (+) causando lisis o rupturas en la pared celular, usualmente por estrés osmótico (Ellis, 1990). Sin embargo, el acoplamiento de esta enzima a matrices poliméricas puede presentar efectos sinérgicos respecto a su actividad biológica, tales como la actividad antimicrobiana y residual. La actividad antimicrobiana de la lisozima se puede mejorar extendiendo su actividad a bacterias Gram (+) mediante la conjugación con goma xanata, un carbohidrato, presentando una inhibición significativa del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *E. coli* en una respuesta dependiente de la dosis, además de mejorar las propiedades espumosas y de emulsión (Hashemi, Aminlari, & Moosavinasab, 2014). La actividad residual de esta enzima acoplada a nanofibras de CS es mayor en comparación con lisozima libre, manteniendo su actividad residual hasta el 73.5%, mientras que en forma libre fue de 59.7%, en un período de incubación de 180 min a 40°C (Park et al., 2013).

También ha sido utilizada como modelo proteico de liberación controlada, ya que sus características como el punto isoeléctrico y su actividad antimicrobiana coinciden con las características de péptidos antimicrobianos, los cuales han ganado interés como nuevos y efectivos agentes antimicrobianos (Piras et al., 2014). Por otra parte, debido a que la lisozima posee la capacidad de degradar parcialmente al quitosano, se ha planteado la posibilidad de cargar esta enzima a matrices poliméricas para acelerar la velocidad de degradación de la misma (Deng et al., 2006).

Con estas propiedades, la investigación en torno a las potencialidades de la lisozima se puede ampliar hacia diferentes tópicos, que abarcan la posible aplicación en la industria farmacéutica y agroalimentaria como un compuesto bioactivo antimicrobiano, así como un ingrediente funcional con cualidades emulsificantes, formador de espumas o como antibacteriano natural en alimentos.

HIPÓTESIS

Los bionanocompositos de quitosano-lisozima, además de presentar actividad antifúngica efectiva contra hongos productores de toxinas como *Aspergillus parasiticus*, no exhiben potencial mutagénico y presentan baja toxicidad. Asimismo, la adición de carragenina permitirá reforzar la matriz del biocomposito quitosano-lisozima-carragenina, sin afectar las propiedades antimicrobianas y toxicológicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico y antifúngico de nanocompositos de base biopolimérica elaborados a partir de quitosano, lisozima y carragenina.

Objetivos Particulares

1. Sintetizar bionanocompositos de quitosano-lisozima y quitosano-lisozima-carragenina mediante nanoprecipitación y complejación iónica y evaluar las propiedades fisicoquímicas de los materiales obtenidos.
2. Evaluar el efecto antifúngico de los bionanocompositos sobre esporas de *Aspergillus parasiticus*.
3. Evaluar el potencial mutagénico *in vitro* y el efecto citotóxico de los bionanocompositos.
4. Evaluar el efecto de la incorporación de carragenina en la matriz biopolimérica y el efecto sobre la morfología de células ARPE, utilizando un sistema *in vitro*.

DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para comprobar la hipótesis de investigación, el trabajo se realizó en dos etapas.

Primera Etapa

A partir de quitosano y lisozima comercial se llevó a cabo la síntesis de biocompositos mediante la técnica de nanoprecipitación. Estos nanocompositos fueron caracterizados fisicoquímicamente y se evaluó su potencial antifúngico, viabilidad y germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus*.

Segunda Etapa

Se sintetizaron partículas a partir de quitosano con carragenina y lisozima comercial mediante la técnica de complejación iónica. Se caracterizaron fisicoquímicamente y se evaluó su actividad biológica mediante el efecto antifúngico de *Aspergillus parasiticus* y su citotoxicidad.

El trabajo realizado de investigación queda formado por los siguientes tres capítulos:

Descripción del Capítulo 1

Consiste en un capítulo de libro correspondiente a la revisión bibliográfica del estado del arte relacionado con el tema de esta investigación. El capítulo fue publicado en el año 2016 en un libro de editorial Elsevier, reconocida a nivel internacional: CHITOSAN in the Preservation of Agricultural Commodities. El título del capítulo es **Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications**. Esta revisión abarca temas generales sobre el quitosano y parámetros que afectan su funcionalidad tales como la fuente de extracción, propiedades químicas, toxicidad y actividad antimicrobiana. Asimismo, técnicas para elaborar bionanocompositos y su asociación con agentes bioactivos, la toxicidad y actividad antimicrobiana que estos presentan.

Descripción del Capítulo 2

El capítulo dos consta de un artículo original derivado de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la primera etapa de la investigación, titulado: **Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus***, que fue publicado en el 2017 en la revista 3 BIOTECH (indizada en el Journal Citation Reports, ISSN impreso 2190-572X y electrónico 2190-5738, factor de impacto 1.497 (2018), Q2). En este artículo se muestran los resultados del efecto antifúngico de las nanopartículas de quitosano-lisozima elaboradas por nanoprecipitación, sobre la viabilidad, germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus* y la producción de β -1,3 glucanasas. De igual manera se muestra la caracterización fisicoquímica de estas nanopartículas. Los resultados fueron favorables en cuanto al control del crecimiento del hongo y la asociación con la producción de enzimas β -glucanasas.

Descripción del Capítulo 3

El capítulo tres corresponde a la segunda etapa de la investigación, específicamente la síntesis y caracterización de las partículas de quitosano, lisozima y carragenina. El artículo original de investigación se titula: **CHITOSAN/CARRAGEENAN/LYSOZYME PARTICLES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Aspergillus parasiticus***, que fue publicado en el 2018 en la Revista Mexicana de Ingeniería Química (indizada en el Journal Citation Reports, ISSN electrónico 2395-8472, factor de impacto 1.097 (2018), Q2). En este artículo se presentan los resultados de la síntesis de partículas a base de quitosano por el método de complejación iónica utilizando carragenina a fin de reforzar la matriz polimérica. Se muestran los datos de la caracterización fisicoquímica y biológica de las partículas resultantes y el efecto antifúngico sobre *Aspergillus parasiticus*, así como las interacciones de sus componentes y la liberación de la lisozima.

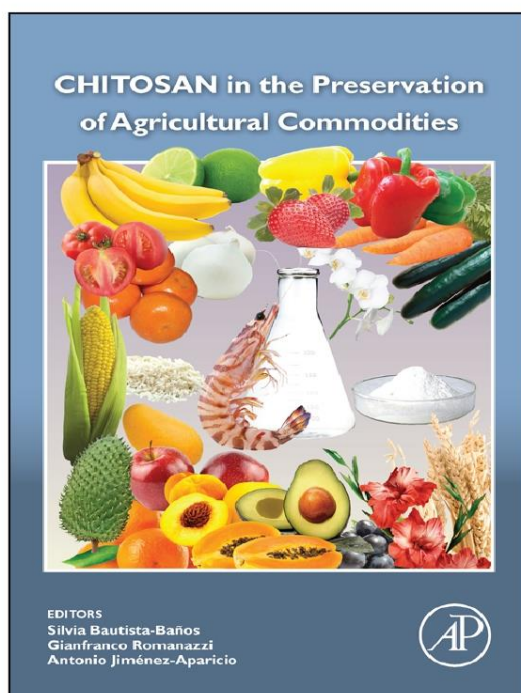
CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica del estado del arte del quitosano y los parámetros de su funcionalidad, toxicidad, actividad microbiana y sistemas nanoestructurados con agentes bioactivos y su actividad biológica.

Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications.

Cynthia Nazareth Hernández-Téllez, Maribel Plascencia-Jatomea, Mario Onofre Cortez-Rocha. En: Silvia Bautista-Baños, editors: Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities, Oxford: Academic Press; 2016, p. 313-338.

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This chapter was originally published in the book *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. The copy attached is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for noncommercial research, and educational use. This includes without limitation use in instruction at your institution, distribution to specific colleagues, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permission site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

From Maribel Plascencia-Jatomea, Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications. In: Silvia Bautista-Banos, editors: Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities, Oxford: Academic Press; 2016, p. 313-338.

ISBN:978-0-12-802735-6

© Copyright 2016 Elsevier Inc.
Academic Press.

CHAPTER 12

Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications

Cynthia Nazareth Hernández-Téllez, Maribel Plascencia-Jatomea,
Mario Onofre Cortez-Rocha

INTRODUCTION

At present, there is considerable interest in processing polymeric composite materials filled with nanosized rigid particles called “nanocomposites.” In these two-phase materials, one of the phases has at least one dimension lower than 100 nm. Nanomaterials constitute an increasingly important nanometric scale product that has become significantly relevant in recent decades. Different nanoparticle (NP) systems have been developed with alternative functions in the industrial area, including food packaging, and particularly in the field of medicine, where they are considered a significant tool. Nanomaterials are used as therapies for the treatment of different diseases, as carriers for controlled drug release, and in medical engineering, among others. Nowadays the development and application of nanocomposites are at a peak. Therefore, due to competition and commercial progress, it has been necessary for companies to focus on innovation and improvement of their productivity in terms of safety, including the use of sustainable packaging and implementation of flexible and standardized technology. Recent progress in nanotechnology provides large companies with the opportunity to rearrange their processes, packaging, and manufacturing schemes [1]. This technology can be used in various areas and allows the development of a wide range of products within the food, medicine, and pharmaceutical industries. Nanomaterials not only include metallic, bimetallic and metal oxide, but also polymeric NPs, as well as advanced materials such as carbon nanotubes and dendrimers; however, considering environmental hazards,

research in this area has been focused on other biodegradable materials that form the basis of “*green nanotechnology*.”

For this reason, nanocomposites made from natural polymers with bioactive compounds are a promising area in the development of bionanotechnology. Due to their biocompatibility, biological activity, and biodegradability, they have had an important role in medicine and pharmaceuticals. Biopolymers such as starch, cellulose, poly(lactic) acid, and chitosan are of increased interest due to consumer awareness of environmental concerns, increased price of crude oil, and global warming. Renewability, low or nontoxicity, biocompatibility, and antimicrobial activity, among other factors, make chitosan-based biocomposites desirable in variety of applications, such as therapeutic aids, medicines, functional coatings, food products, and antimicrobial packaging materials.

Biocomposites are composite materials comprising one or more phase(s) derived from a biological origin. In terms of the reinforcement, they may include plant fibers such as cotton, flax, hemp, or fibers from recycled wood or waste paper, or even by-products from food crops. The manufacturing of true biocomposites demands that the matrix be made predominantly from renewable resources, although the current state of biopolymer technology dictates that synthetic thermoplastics and thermosets dominate commercial biocomposite production. In this regard, several nanoparticulated systems have been developed using biopolymers as a base, the study of which has focused primarily on the encapsulation efficiency of the active compound added to the polymer matrix [2] and loading capacity [3] in the controlled-release rates [4] and in various chemical and physical analysis [5]. However, few studies document the toxicity and biosafety of these NPs in several biological systems.

The NPs have highly particular characteristics that can fail when exposed to living organisms including humans, animals, and plants. Because of their size, they possess the ability to enter the cell membranes, having an area/volume ratio that provides them with a large contact surface and high reaction capacity. Because of these intrinsic characteristics, added to the fact of being made from natural compounds, the NPs may be toxic. This toxicity is associated with cellular damage caused by an accumulation in tissues and organs as a result of exposure to a given dose.

Agriculture is one promising area of application for chitosan-based NPs as a controlled-release system. Agriculture and the food it produces are becoming increasingly important in a world of diminishing resources and an ever-increasing global population. Given this increasing world population, it is necessary to use modern technologies such as nanotechnology and nanobiotechnology in agriculture and food sciences. Strategies to apply

nanoscience to the food industry are quite different from the more traditional applications in biosciences and engineering. Food processing is a multitechnological manufacturing industry that involves a wide variety of raw materials, high biosafety requirements, and well-regulated technological processes. Four major areas in food science and production may benefit from nanotechnology: development of new functional materials (NPs, nanoemulsions, nanocomposites, nanostructured materials), microscale and nanoscale processing (heat/mass transfer, nanoscale reaction engineering, nanobiotechnology, molecular synthesis), product development (delivery, formulation, packaging), and methods and instrumentation design for improved food safety and biosecurity (nanosensors, nanotracers) [6,7].

Nanotechnology has a tremendous potential to revolutionize agriculture. Nanoagriculture focuses currently on target farming that involves the use of nanosized particles with unique properties to boost crop and livestock productivity. Agri-food nanotechnology is multidisciplinary in nature, and application to the agriculture and food sectors is relatively recent compared with its use in drug delivery and pharmaceuticals [7,8]. These applications include agriculture, hydroponics, agrochemicals, livestock, nanobiotechnology, nanotoxicology, nanotechnology, nanofood, functional nanocomposites, and biotechnology. Nanotechnology has the potential to protect and monitor plant growth, detect plant and animal diseases, increase global food production, enhance food quality, and reduce waste for sustainable intensification [7]. Food and agricultural production are among the most important fields of nanotechnology application.

Nanotechnology in agriculture has gained momentum in the last decade with an abundance of public funding, but the pace of development is modest, even though many disciplines come under the umbrella of agriculture. This could be attributed to (i) the scale of demand of input materials always being gigantic in contrast with industrial nanoproducts; (ii) an absence of control over the input nanomaterials in contrast with industrial nanoproducts and because their fate has to be conceived on the geosphere; (iii) the time lag of emerging technologies reaching the farmers' fields, especially given that many emerging economies are unwilling to invest in innovation; and (iv) the lack of foresight resulting from agricultural education, where personnel from kindred disciplines might lack an understanding of agricultural production systems. If these issues are addressed, nanotechnological intervention in farming has bright prospects for improving the efficiency of nutrient use through nanoformulations of fertilizers, breaking yield barriers through bionanotechnology, surveillance and control of pests

and diseases, understanding the mechanisms of host-parasite interactions at the molecular level, development of new-generation pesticides, preservation and packaging of food and food additives, removal of contaminants from soil and water, and improving the shelf life of vegetables and flowers, to name a few [9].

In this review, issues related to the development of bionanocompounds prepared from chitosan and bioactive compounds are discussed, as well as the toxic and antimicrobial effect of both chitosan and chitosan bionanocomposites. Aspects related to the main NP's obtaining methods and environmental implications associated with the use of nanomaterials in the agricultural area are also considered.

CHITOSAN

Source and Chemical Properties

The term *chitosan* describes a heterogeneous group of polymers that differ in molecular weight (MW), viscosity, degree of deacetylation, and pKa, among other physiochemical characteristics. Chemically it is a binary linear high MW copolymer comprised of β -1,4-D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine chains. It constitutes the only cationic polysaccharide from natural origin. The physical properties of the polymer vary according to a number of parameters such as MW (of approximately 10,000–1,000,000 Da), deacetylation degree (ranging between 60% and 95%), and the purity and sequence between the amino and acetamide groups. Due to its specific and rigid structure, chitosan is able to exist in nature in different polymorphic forms, whose properties vary considerably [10].

Chitosan is obtained by partial chemical or enzymatic deacetylation of chitin, which is the second most abundant natural polymer after cellulose, with a regeneration rate of 10^{9-11} tons per year in the biosphere. The main source of chitinous polymers is crustacean shells, cuticles from insects, and cell wall of fungi. The amino group of chitosan allows the polymer to be soluble in diluted organic acids and the degree of deacetylation determines the number of amino groups present in the polysaccharide, thus influencing their functionality [11].

Chitosan is considered to be a biologically compatible polymer for humans and most animals, and is approved for use in diet in Japan, Italy, and Finland. The chitosan obtained from shrimp was designated as GRAS (generally recognized as safe) on 2005 by the USFDA (US Food and Drugs Administration), based in the scientific procedures for use in food in general, in

accordance with Good Manufacturing Practice regulations [10]. However, some modifications implemented in chitosan can generate chitosan derivatives with a degree of toxicity, and like any residual reactive, it should be handled with care.

In addition to biocompatibility and low or null toxicity, chitosan has interesting properties, such as biodegradability and versatile physicochemical properties, which make it attractive; it has had a wide range of applications in several fields such as food, cosmetics, biomedicine, agriculture, and wastewater management [1,8,10]. A novel application is in the design of functional and biodegradable materials, which constitutes a promising alternative to the use of polymeric materials that result from the constant production of these leaders in environmental pollution [12]. One of the applications of interest for chitosan is the development of biodegradable materials, with potential application both in food packaging for preservation and shelf-life extension [13], and in agriculture for the release of bioactive compounds, an understudied area of application.

Toxicity

Current studies show that, in general, chitosan is a relatively nontoxic and biocompatible material (Table 12.1). However, care must be taken to ensure that it is pure, as protein, metal, or other contaminants could potentially cause many deleterious effects both in derivative syntheses and in dosage forms. After derivatization (or cross-linking), unreacted reagents should be thoroughly removed to prevent confounding results as many reagents are cytotoxic uncoupled. Many enzymes seem to have activity, at least *in vitro*, against chitosan but derivatives could give indigestible molecules. The biodistribution is both MW and formulation dependent, with relatively long circulation times achievable. The biodistribution is controllable through route of administration, dosage form, and chitosan characteristics. Intravenous distribution can be tuned using particle size (<100 nm), and the liver appears to be a primary site of localization [14].

It has been reported that chitosan derivatives do not generate any chronic toxicity in *in vivo* animal models. No death or other signs of toxicity are observed in mice during the peroral treatment with different derivatives of chitosan (30 mg/kg body weight for 1 month), thus establishing their safe application in oral insulin delivery. Also, no changes are observed in the architecture of the internal organs such as liver and kidney of the treated groups. Moreover, studies have shown that the intestinal luminal microbes cause successful biodegradation of these polymers (chitosan and their derivatives) [15].

Table 12.1 Toxicity of chitosan and chitosan derivatives

Chitosan details (DD, MW)	Modification	Assessment	IC ₅₀
95% DD, 18.7 kDa	Steric acid conjugation micelle	<i>In vitro</i> , A549 cells	369 ± 27 µg/mL
95% DD, 18.7 kDa	Steric acid conjugation and entrapment in micelle	<i>In vitro</i> , A549 cells	234 ± 9 µg/mL
97% DD, 65 kDa	N-octyl-O-sulfate	<i>In vitro</i> , primary rat hepatocytes	>200 mg/mL
87% DD, 20, 45, 200, 460 kDa	None, aspartic acid salt	<i>In vitro</i> , Caco-2 cells, pH 6.2	0.67 ± 0.24, 0.61 ± 0.10, 0.65 ± 0.20, 0.75 ± 0.16 mg/mL
87% DD, 20, 45, 200, 460 kDa	None, glutamic acid salt		0.56 ± 0.10, 0.48 ± 0.07, 0.35 ± 0.06, 0.46 ± 0.06 mg/mL
87% DD, 20, 45, 200, 460 kDa	None, lactic acid salt		0.38 ± 0.13, 0.31 ± 0.06, 0.34 ± 0.04, 0.37 ± 0.08 mg/mL
87% DD, 20, 45, 200, 460 kDa	None, hydrochloride salt		0.23 ± 0.13, 0.22 ± 0.06, 0.27 ± 0.08, 0.23 ± 0.08 mg/mL
78% DD, <50 kDa	None, lactic acid salt	<i>In vitro</i> , B16F10 cells	250 mg/mL
82% DD, 150–170 kDa	None, lactic acid salt	<i>In vitro</i> , B16F10 cells	2.00 ± 0.18 mg/mL
>80% DD, 60–90 kDa	None, glutamic acid salt	<i>In vitro</i> , B16F10 cells	2.47 ± 0.14 mg/mL
77% DD, 180–230 kDa	None, lactic acid salt	<i>In vitro</i> , B16F10 cells	1.73 ± 1.39 mg/mL
85% DD, 60–90 kDa	None, hydrochloric acid salt	<i>In vitro</i> , B16F10 cells	2.24 ± 0.16 mg/mL
81% DD, 100–130 kDa	None, hydrochloric acid salt	<i>In vitro</i> , B16F10 cells	0.21 ± 0.04 mg/mL
100% DD, 152 kDa	Glycol chitosan	<i>In vitro</i> , B16F10 cells	2.47 ± 0.15 mg/mL
100% DD, 3–6 kDa	20, 44, 55% Trimethyl chitosan, chloride salt	<i>In vitro</i> , MCF7 and COS7 cells, 6 h & 24 h	>10 mg/mL

100% DD, 3–6 kDa	94% Trimethyl chitosan, chloride salt	<i>In vitro</i> , MCF7, 6 h	1.402 ± 0.210 mg/mL
100% DD, 3–6 kDa	94% Trimethyl chitosan, chloride salt	<i>In vitro</i> , COS7, 6 h	2.207 ± 0.381 mg/mL
100% DD, 100 kDa	36% Trimethyl chitosan, chloride salt	<i>In vitro</i> , MCF7, 6 h	0.823 ± 0.324 mg/mL
100% DD, 100 kDa	36% Trimethyl chitosan, chloride salt	<i>In vitro</i> , COS7, 6 h	> 10 mg/mL
84.7% DD, 400, 100, 50, 25, 5 kDa	40% Trimethyl chitosan	<i>In vitro</i> , L929 cells, 3 h	30, 70, 90, 270, > 1000 µg/mL
84.7% DD, 1.89 MDa	12% PEG modified 40% trimethyl chitosan	<i>In vitro</i> , L929 cells, 3 h	220 µg/mL
84.7% DD, 3.6 MDa	25.7% PEG modified 40% trimethyl chitosan	<i>In vitro</i> , L929 cells, 3 h	370 µg/mL
84.7% DD, 300 kDa	6.44% PEG modified 40% trimethyl chitosan (and all PEG modified TMC with lower Mw)	<i>In vitro</i> , L929 cells, 3 h	> 500 µg/mL
97% DD, 65 kDa	N-octyl-O-sulfate	<i>In vivo</i> , 1V, mice	102.50 mg/mL
97% DD, 65 kDa	N-octyl-O-sulfate	<i>In vivo</i> , 1P, mice	130.53 mg/mL

Source: Kean and Thanou [14].

Chitosan can be found in many shapes and sizes, varying in their degree of deacetylation (DD) and average MW, which have impacts on their biological activity and toxicity. In a controlled-release system, chitosan normally act as carrier excipient of the active compound, therefore its internalization, distribution, and toxicity should be studied following its consumption.

It is considered that in vertebrates, chitosan is degraded in the colon and different enzymes act, mainly lysozyme and bacterial enzymes. Nevertheless, three different human chitinase enzymes showing activity have been identified. In general, microorganisms synthesize and/or degrade chitin, the natural precursor of chitosan, through the use of microbial chitinases that hydrolyze the *N*-acetyl- β -1,4-glucosamine joints randomly. The rate of biodegradability in living organisms depends on the chitosan deacetylation degree; if the deacetylation degree increases, the degradation rate decreases [14,16].

Antimicrobial Activity

Chitosan has antimicrobial activity against certain microorganisms such as filamentous fungi, yeast, and Gram-positive and Gram-negative bacteria. This activity is more bacteriostatic than bactericidal and depends on the type and concentration of chitosan, its MW and degree of deacetylation, the type of microorganism, and microbial growth time, among other factors. However, the degree of deacetylation is the factor having the most influence on the antimicrobial activity of chitosan, because the amount of free amino groups in the molecule has been related to this activity. The antimicrobial activity is different among the strains, which implies a more complex antimicrobial mechanism than anticipated [8,11].

Several mechanisms have been proposed to explain the antimicrobial activity of chitosan, and the main mechanism is the charge interaction, which is attributed to the interaction between the positive charges of chitosan and the negative charges of cell walls. Another mechanism involves the chelating activity of chitosan amino groups on trace metals outside cells (Fe, Cu, Zn, and Mo), which are essential for the growth of an organism. The interference in protein synthesis as a consequence of the membrane damage caused by charge interaction with chitosan is a mechanism that involves the ability of chitosan to pass through the cell membrane of a microorganism, and subsequently bind to DNA and interfere with protein synthesis. Experimental results show that charge interaction as an antimicrobial mechanism of chitosan involves the following: cell permeability alteration, cell membrane structural damage, and charged group interactions [8,17].

The ability of chitosan to pass through cell membranes apparently depends on the membrane composition, those cells with a high content of polyunsaturated fatty acids being more sensitive to chitosan. Palma-Guerrero et al. [18] observed a greater antifungal effect of rhodamine-labeled chitosan on *Fusarium oxysporum* than on *Pochonia chlamydosporia*. Chitosan penetrated cell membranes of *F. oxysporum* by plasma membrane permeabilization, resulting in cell lysis.

When used to enhance plant defenses, chitosan induce host defense responses in both monocotyledons and dicotyledons. To counteract the negative effect or contamination caused by viruses, fungi, bacteria, and insects, plant cells treated with chitosan increase their production of phytoalexins, protease inhibitors, lignin, oxygen-reactive species, phenolic compounds (ferulic acid, salicylic acid, *p*-Coumaric acid), and defense enzymes such as chitinases, chitosanases, glucanases, and phenylalanine ammonia-lyases. According to the induction mechanism in vegetal cells, chitosan activates the production of 1,3- β -glucan synthase in the plant cell wall, resulting in (i) the accumulation of β -glucan, (ii) changes in protein phosphorylation/dephosphorylation reactions, (iii) an increase in internal calcium concentration, (iv) a decrease in internal potassium concentration, (v) a decrease in internal pH, and (vi) changes in jasmonic acid production [8]. Responses also include ion flux variations, cytoplasmic acidification, membrane depolarization and protein phosphorylation, and the expression of unique early responsive and defense-related genes. In addition, chitosan was reported to induce callose formation, proteinase inhibitors, and phytoalexin biosynthesis in many dicot species. The response to chitosan and derived oligosaccharides varies with their acetylation degree [19]. The structural shape and physical condition found in chitosan is a crucial factor and has great influence in its antimicrobial activity; this aspect should be highly considered, yet is often underestimated [20].

In agriculture, some fungi produce polluting toxins during the storage of various products, causing significant economic losses associated with impacts on human health, animal productivity, and international trade, which has attracted the attention of scientists and politicians worldwide. It has been estimated that 25% or more of agricultural products are contaminated with mycotoxins. The aflatoxins are termed as polyacetic natural compounds and are produced mainly by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* at the end of the exponential growth phase; they are the main pollutants of products such as corn, peanut, cotton, nuts, rice, tobacco, and spices [21].

Aflatoxin B1 is the most important due to its high toxicity to humans and animals. Depending on the duration and level of exposure, aflatoxins are hepatotoxic and carcinogenic. Cota-Arriola et al. [22] evaluated the fungistatic activity of chitosan against *A. parasiticus*, finding an inhibitory effect to concentrations of 6.7 and 10.7 g/L (CI_{50}) to the biopolymer, which made it possible to slow the growth of the fungus by 50% at 122 h. Thus, the chitosan (CI_{50}) strongly inhibited the radial growth until 122 h and the germination of spores by more than 50% before 8 h. Compared with the control, the chitosan significantly decreased Aflatoxin B1 production at 8 d; however, the total *A. parasiticus* aflatoxins production increased notably.

The use of chitosan for the control of postharvest diseases caused by toxigenic fungi has attracted considerable attention because of the problems associated with the use of chemical agents, which also negatively affect environmental pollution through the generation of hazardous waste in food products and the growth of chemical treatment-resistant fungi species. This has increased interest in the study and use of antimicrobial compounds obtained from natural sources. Antimicrobial properties of chitosan, which have been widely documented, constitute a starting point for the study and development of nanoparticulated systems elaborated with natural bioactive compounds, designed to counteract different problems that can be resolved through the use of this technology [8,23]. In this regard, there are different studies on the antimicrobial activity of chitosan NP systems, which are commonly accompanied by an active compound for their release at a certain system. This active compound can have an organic or inorganic origin. Recent studies have demonstrated the metallic NPs have a strong antimicrobial effect; however, it is also stipulated that prolonged exposure to this type of nanomaterials can lead to toxicity [24].

Chitosan-Based Bionanocomposites

NP systems represent an emerging group of hybrid materials that are formed by a combination of natural polymers and inorganic solids and exhibit a structural improvement and functional properties of great interest for different applications. The inherent properties of biopolymers, such as its compatibility and biodegradability, open new perspectives associated with the development of bionanocomposites, with special applications in agriculture and the development of environmentally friendly materials [13].

It has been suggested that the inherent properties of packaging materials based on biopolymers can be surpassed by technology of nanocomposites, which exhibit increased barrier properties, increased mechanical strength,

and improved resistance compared to the pure polymers and conventional compounds [25].

Bionanocomposites or “green nanocomposites” open an opportunity for the use of novel functional materials based on their high yield that can replace conventional oil-based plastic packaging materials [26]. Thus the development of biologically based polymers such as chitosan and the use of innovative technologies can reduce dependence on fossil fuels. However, the new physicochemical properties of these nanomaterials emphasize the need to adequately evaluate the potential effects and risks to human health, specifically regarding possible cytotoxicity. Even though evidence suggests that these materials can have an adverse effect on human health, the cause/effect relationship is not yet fully understood [27].

Over the past era, research in functional biomaterials such as chitosan has led to the development of new drug delivery systems and superior regenerative medicine, currently one of the most quickly growing fields in the area of health science. Chitosan, well known due to its biological properties and versatility, clearly has greater potential for future development in different fields of science, namely drug delivery, gene delivery, cell imaging, and sensors; in the treatment as well as diagnosis of some diseases such as cancer; and recently in food and agriculture. Chitosan-based nanomaterials have superior physical and chemical properties such as high surface area, porosity, tensile strength, conductivity, and photoluminescence as well as increased mechanical properties in comparison to pure chitosan [28].

At present, a large number of studies have focused on antimicrobial or pesticide encapsulates, establishing the dosage required to control microbial growth; however, this method of control does not completely solve the problems associated with the indiscriminate use of synthetic chemicals. For this reason, it is necessary to continue the search for viable natural alternatives capable of forming controlled-release matrices for agricultural use, such as chitosan, which may hold active compounds with antimicrobial activity [8].

Many studies examine the encapsulation of compounds in chitosan-based micro- and NPs. Because the pharmaceutical industry is the main area of application of chitosan-based matrices for the controlled release of drugs, most of the processes to obtain micro- and NPs have been adapted to this area [29]. Currently, human implant materials based on chitosan have been designed in the biomedical area; they exhibit high antibacterial activity that can be used to control potential infections. These materials are based

mainly on the use of micro- and NPs of chitosan with metal ion incorporation to increase their antibacterial potential [30]. The study of controlled-release matrices based on chitosan has been focused on pharmaceutical and biomedical sciences; therefore, it is important to apply this technology to other areas of research such as food and agriculture that have not been well explored. Table 12.2 shows some studies and applications of compounds encapsulated in chitosan-based matrices [8].

Plagues are among the main causes of agricultural losses; therefore, insecticides are an important control tool. However, collateral effects such as environmental contamination, human poisoning, reduction in the number of natural enemies, and insecticide resistance by plague insects, among others, may be credited to their indiscriminate use. Formulations containing pesticides have been prepared in colloidal suspensions or powder in nanoscale, where they present advantages such as increasing stability of the active organic compound (UV, thermal, hydrolysis, etc.), foliar settling, reduction in foliar leaching, systemic action, synergism, and specificity. Consequently, the amount of pesticide necessary, the number of applications, and the environmental impact, along with human exposure to pesticides are reduced. The nanoformulations have been employed not only for synthetic pesticides but also in alternative natural products (herbal extracts) and entomopathogenic microorganisms to control insect pests [31].

METHODS FOR OBTAINING NANOPARTICULATED SYSTEMS

Controlled-release nanoparticulated systems vary in their structure and morphology. They can be particulate, in the form of fibers, capsules, layers, or micelles, all of them in a nanometric scale. The final shape and functionality depends on the elaboration method. In this regard, several methods have been developed for preparing and obtaining chitosan-based microparticles and NPs. Emulsion-drip precipitation, cross-linking, spray drying, ionic gelation, and nanoprecipitation are among the most commonly used methods.

Emulsion-Droplet Coalescence Method

The emulsion-droplet coalescence method developed by Tokumitsu et al. [32] utilizes the principles of the emulsion, both cross-linking and precipitation. However, in this method, instead of stable drops cross-linking, precipitation is induced by allowing chitosan droplet coalescence with NaOH drops. First, a stable emulsion containing an aqueous chitosan solution along

Table 12.2 Food and agricultural applications of active compounds encapsulated in chitosan-based controlled-release matrices

Matrix	Bioactive compound	Characteristics
Food applications		
Chitosan and chitosan/alginate microparticles	Tannic acid (antioxidant)	Diameter of 3–6 μm , entrapment efficiency of 14–28.9%
Chitosan/glutaraldehyde microcapsules (emulsion/casting)	Astaxanthin (antioxidant)	Spherical shape, diameter of 5–50 μm
Chitosan NPs (ionic gelation cross-linked sodium tripolyphosphate)	Catechins (antioxidant)	Encapsulation efficiency of 24–53%
Chitosan microspheres (spray drying)	Olive leaf extract (antioxidant)	Spherical shape, uniform particle size distribution, encapsulation efficiency of up to 27%
Chitosan microspheres (ionic gelation cross-linked sodium tripolyphosphate)	Vitamin C (antioxidant)	Size of 3.1, 4.9, and 6.7 μm , encapsulation efficiency of 67.25, 60.43, and 52.74%
Chitosan microcapsules (O/W emulsification)	Volatile citronella oil (flavor)	Size of 225 ± 2 to 131 ± 20 μm , encapsulation efficiency of 98.2–95.8%
Chitosan/arabic gum microcapsules stabilized with sodium dodecyl sulfate	Citral and limonene (flavor)	Citral particle diameter of 0.25, 0.41, and 1.1 μm ; limonene particle diameter of 0.25, 0.37, and 0.99 μm
Chitosan NPs (ionic gelation cross-linked sodium tripolyphosphate)	Riboflavin/ β -lactoglobulin (vitamin)	Size of 100–200 nm, surface charge of 20–60 mV, encapsulation efficiency of 60%
Chitosan/linoleic acid nanocapsules (O/W emulsification with methylene chloride)	Linoleic acid (oil)	Size of 200–600 nm, encapsulation efficiency up to 50%
Agricultural applications		
Chitosan gel beads (with acetic or propionic anhydride)	Herbicide atrazine and fertilizer urea (agrochemical)	Extended release period of atrazine to 7 months; chitosan-coated urea beds extended action of urea release (up to 180 h)
Chitosan microcapsules (precipitation)	3-hydroxy-5-methylisoxazole (herbicide)	Size of 5 μm ; sustained release of active material in water for 80–160 h

Source: Adapted from Cota-Arriola et al. [8].

with the active compound is produced in liquid paraffin oil, and then another stable emulsion containing a NaOH aqueous solution is produced in the same manner. When both emulsions are mixed at high-speed agitation, the drops from each emulsion can collide randomly and merge, precipitating chitosan droplets to give small-sized particles.

Cross-Linking

This method involves the cross-linking of chitosan amino groups with aldehyde groups of a cross-linker agent. An emulsion of water in oil is prepared and stabilized with a surfactant. Then, the emulsion is combined with a cross-linking agent such as glutaraldehyde to form spheres. Subsequently, spheres are filtered and washed with hexane or dry alcohol. The particle size is controlled by the size of the emulsion dripping interacting with the cross-linking means, the cross-linking degree, and the stirring speed. The method has its inconveniences; it is tedious and may generate chemical reactions with the active agent. The parameters affecting the preparation and performance of the spheres are the MW and the concentration of chitosan, as well as the type and concentration of surfactant [33].

Spray Drying

Spray drying is a known technique to produce powders, granules, or agglomerates of mixed drug solutions, excipients, and suspensions. It is based on the drying of atomized drops in a hot air stream. In this method, chitosan is first dissolved in acetic acid in aqueous solution; the drug is dissolved or dispersed in the solution, and then the adequate cross-linking agent is added. This solution or dispersion is atomized in a hot air stream, which leads to the formation of small drops of solvent, from which it instantly evaporates and leads to the formation of freely flowing particles. Various process parameters must be controlled in order to obtain the desired particle size, which depends on the nozzle size, spray flow speed, atomization pressure, inlet air temperature, and the extent of cross-linking [33].

Ionic Gelation

The use of complexes between macromolecules of opposite charge to prepare chitosan microspheres has attracted much attention because the process is simple and smooth. Moreover, electrostatic interactions have been applied by reversible physical cross-linking instead of chemical cross-linking, to avoid the possible toxicity of the reactants and other undesirable effects. Tripolyphosphate (TPP) is a polyanion that interacts with the chitosan by electrostatic

forces. In the ionic gelation method, chitosan is dissolved in aqueous acid solution to obtain the polycationic chitosan. Then, this solution is added dropwise to the solution under constant TPP polyanionic agitation. Due to the complexity between oppositely charged species, the chitosan undergoes ionic gelation and precipitation to form spherical particles. However, the microparticles formed by TPP/chitosan have poor mechanical strength, which limits their use in the release of drugs or active compounds [23].

Nanoprecipitation

This method has numerous advantages: it is a simple, quick, and easy-to-perform technique. The formation of NPs is instantaneous and the procedure is performed in one step. It requires using two miscible solvents, the first to dissolve both the polymer used as the drug (solvent), while the latter must be insoluble for both (nonsolvent). Nanoprecipitation occurs when the polymer in solution (solvent) comes in contact with the nonsolvent; a displacement of solvent occurs and the polymer chains start to fold, leaving the active compound trapped. The predominant effect in this process is called “Marangoni,” which is the mass transfer between two turbulent phases caused, in this case, by the solvent and nonsolvent. Some of the complex phenomena involved in this precipitation system are the flow, diffusion, and variations in surface tension. Besides the chitosan, other types of polymers have also been used for the formation of NP systems through this technique, such as polylactic acid and cellulose derivatives [23,33–35].

Selecting the most appropriate method depends on the final product and the particular objectives required as well as on the particle size, thermal stability, time of release of the active compound, and the toxicity of the end products, among others. The release of the bioactive compound from particle systems will depend on the density of the polymer matrix [8,23].

TOXICITY OF CHITOSAN-BASED NPs

Despite the potential benefits that nanotechnology offers in the agri-food sector, little is known about safety aspects of the application of nanotechnologies in food production and the incorporation of NPs in food. Risk assessment procedures are not specific to agri-food nanomaterials, resulting in uncertainty regarding the nature and extent of potential risks in most cases. Applications for nanomaterials currently used for meat, and food generally, include the use of NPs and nanomaterials as food ingredients or additives that are placed directly into food or as a part of food packaging. Also, the

release of engineered NPs may cause adverse effects on edible plants, and the potential risks and benefits of using nanosilver as an antibacterial agent in consumer and health care products are being debated globally [36].

In 2012, a new biocidal product regulation (EU 528/2012) was adopted in the European Union. The regulation specifically requires assessment and approval of active nanomaterial biocidal ingredients. Also, on February 12, 2014, the European Parliament Committee on the Environment, Public Health and Food Safety rejected a proposed regulation that would define “engineered nanomaterials” in food. Such definition could lead to existing nanomaterials not being labeled due to an exemption provided for food additives approved on a European Union list [7].

As it occurs with nanostructured materials, chitosan-based elaborated NPs have a chemical composition, size, shape, solubility, electric charge, and surface structure that allow them to easily cross through membranes or link to organic compounds such as proteins. Because of this, the NPs are superior in their toxic or pharmacological action compared to other size particles, such as microparticles, even made of the same molecules. The biokinetics of these materials adjust the dose to know exactly the amount of material that reaches the organs. A dose of a drug encapsulated in NPs can lead to the onset of more severe side effects than the same dose in a common formulation [37].

With respect to its toxicity, it has been reported that cell death by apoptosis and inflammation are the most common and most widely toxic effects reported. Cell death is caused by prolonged exposure dose due to the accumulation of metals or other drugs, either within the cell or by macrophage phagocytosis [37]. Some authors have suggested possible cytotoxic effects associated with the type of salt and polymer MW [38–40]. A specific property of the NPs is their ability to cross through biological barriers by a process called translocation. This process can be found in other parts of the organism, at sites other than the entrance point, maintaining their integrity as particles without any NP dissolution occurring. Multiple factors are involved in cellular internalization routes and targeting of the main modes of uptake, endocytosis, and direct crossing of the plasmatic membrane (translocation) [37,41].

By increasing the specific contact surface of the NPs, its reactive or catalytic potential increases, which in some cases can lead to the formation of oxygen reactive species (ORS) in mammal or microbial cells [38–40]. From this it follows that the smaller a particle is, the greater its reactivity will be, so that a substance, which is inert at a micro or macro scale, can be toxic at the

nanoscale. NPs may be located within the cell in organelles where macroscopic particles fail to reach, showing specific cellular responses [8,23]. NPs of a different nature have been used in the other studies, being the metallic NPs of silver and gold, the most studied [24,37]. Despite the good results in the use of metallic NPs, several authors recommend limited use and short time exposures to these nanomaterials, because prolonged exposure may cause adverse bioaccumulation and damage to the body.

Because chitosan NPs at a size of 200 nm caused malformations (bent spine, pericardial edema, and an opaque yolk), an increased rate of cell death, high expression of ROS, and overexpression of heat shock protein 70 in zebrafish embryos [42], it is important to study the biosecurity associated with the use of chitosan NPs in agriculture. Toxicity of biodegradable nanocarriers such as chitosan NPs must be addressed, especially considering the *in vivo* distribution of these nanoscaled particles, which can involve beneficial microorganisms and animals. Despite the existing database on NPs, no blanket statements about human toxicity can be given at this time. In addition, limited ecotoxicological data for nanomaterials preclude a systematic assessment of the impact of NPs on ecosystems [43].

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN-BASED NPs

One of the properties exhibited by the biopolymer NPs is their antimicrobial activity. Antimicrobial capacity is credited naturally to the chitosan nanoparticulated systems because it is a cationic biopolymer, being the main action mechanism destabilizing the microbial membranes with negative charges present while interacting with chitosan positive charges ($-\text{NH}_2$).

The size of NPs, especially high MW chitosan NPs, is greatly influenced by the concentration of chitosan that was added into a constant amount of TPP. A linear relationship was observed in which an increase in concentration would increase particle size. A similar relationship was observed with the MW of chitosan in which the effect on particle size was also prominent. The linear relationship between chitosan MW and particle size/zeta potential has been statistically proven, which provides a platform for easy manipulation of physicochemical properties of NPs suitable for their intended application. Formulation of chitosan into NPs was found to increase its antifungal effect significantly [44]. Therefore, it is anticipated that chitosan NPs have the potential of becoming a powerful and safe natural antifungal agent.

Zeta potential has been suggested as a key factor contributing to antifungal effect of chitosan through the interaction with negatively charged

microbial surface [45]. Zeta potential of chitosan NPs showed a net positive surface charge due to excess positive charge of chitosan molecules after interaction with TPP, which proved that the magnitude of particle positive charge increased linearly with the increasing concentration or MW [44].

Hsu et al. [24] found that the chitosan NPs with silver showed an antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* at a concentration of 120 ppm. Furthermore, it was observed that small amounts of Ag NPs can induce significant changes in the physicochemical properties of chitosan, such as a good dispersion and homogeneity in the produced matrix and increased nanocrystalline domains, therefore it may increase its biocompatibility and potential in wound treatment. Silver NPs also exhibit strong antibacterial activity in addition to anti-inflammatory properties. The postulated mechanism is associated with the release of silver ions of the NPs in the presence of water that, at a nanoscale, can penetrate the bacterial wall and easily damage the structure, altering its permeability [46]. Few studies have been conducted on the antifungal effect of chitosan. One of them was carried out by Cota-Arriola et al. [23] in which they studied chitosan TPP NPs with sizes between 80 nm and 20 nm. The particles were evaluated for their antifungal potential against *Aspergillus parasiticus*, and an increased antifungal potential was observed compared to the chitosan solution. Researchers also observed damage characterized by morphological changes in hyphae and spores. NP size and the availability of the functional groups CS/TPP (amino and phosphate group) suggest a possible synergistic effect between the CS and TPP.

Nanosized chitosan NPs contribute to a larger surface area, causing them to be able to adsorb more tightly onto the surface of fungal cells and disrupt the membrane integrity. Ma and Lim [47] reported that cellular uptake of chitosan NPs into cells was higher than that of chitosan molecules because the bulk chitosan molecules were located extracellularly. This suggested that chitosan NPs might be able to diffuse into the fungal cell and hence disrupt the synthesis of DNA as well as RNA, which could explain a better antifungal activity of chitosan NPs compared to its free polymer or solution form. It has been documented that the shape, size, and nature in which a material is supplied to an organism is crucial for disposal. It is therefore important to determine whether the chitosan NPs may present a risk and bioaccumulation in living organisms.

Antimicrobial properties are attributed to chitosan NPs [8,17]. However, Leitgeb [48] found that chitosan NPs covered with magamita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), at concentrations of 10–30 mg, did not exhibit inhibitory effect over the *in vitro* growth of some bacteria such as *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Enterococcus faecalis*, and *Klebsiella pneumoniae*. The authors concluded that the chitosan NPs do not have a toxic effect on bacteria at the concentration used, suggesting that chitosan micro- and NPs are good carriers of biologically active substances, in addition to being biocompatible and nontoxic [48].

On the other hand, native intracellular delivery of active proteins is challenging because of the fragility of most proteins. Recently, a study of chitosan NPs loaded with lysozyme as a model drug of an antimicrobial protein was performed. NPs with a diameter of 150 nm and prepared by the method of ionic gelation, effectively maintained the antibacterial activity of the enzyme (lysozyme), which was slowly released for 3 weeks *in vitro* and was active toward *Staphylococcus epidermidis* until 5 days of incubation. Furthermore, NPs loaded with lysozyme showed complete *in vitro* cytocompatibility toward murine fibroblasts [3].

CHITOSAN-BASED NANOPARTICULATED SYSTEMS LOADED WITH BIOACTIVE COMPOUNDS

In recent years the interest in developing matrices from natural polymers has increased, which results in a controlled-release system that provides a continuous dosing of functional compounds. However, in the food industry, developing versatility and highly responsive delivery systems remains a challenge [49]. The nanolayer coatings have promising applications in a wide range of areas including pharmaceutical, biomedical, and food packaging. The release of bioactive compounds of polymeric matrices can occur due to diffusion mechanism, swelling of the polymer matrix, polymer erosion, and degradation [8,49]. This behavior can prevail through different mechanisms, depending on the system and environmental conditions.

In this regard, some studies related to the release of functional compounds have been made. Pinheiro et al. [49] formulated nanolayer coatings composed of K-carrageenan and chitosan, an anionic and cationic polysaccharide respectively. This matrix was used for the release of the model cationic compound methylene blue, which was incorporated in different positions of the nanoshell. The result was that the release and transport of dye are associated with the concentration gradient and the relaxation of nanolayers, and are dependent on the temperature, pH of the medium, and the position of the methylene blue molecule incorporated into the nanolayers of K-carrageenan-chitosan, which suggests different mechanisms of action.

Xu and Du [50], using ionotropic gelation with TPP, developed chitosan NPs and assessed the release of bovine serum albumin (BSA), and found that the MW and degree of deacetylation of chitosan, the initial concentration of BSA, and the presence of polyethylene glycol (PEG) in the encapsulation medium were the factors that affect the release properties of BSA. When increasing the MW of the chitosan of 10–210 KDa, the encapsulation efficiency was doubled; furthermore, the release of BSA in PBS medium (pH 7.4) was reduced from 73.9% to 17.6% after 8 days. The increase in the degree of deacetylation from 75% to 92% slightly promoted encapsulation efficiency and slowed the release rate. Moreover, the encapsulation efficiency was significantly decreased due to the increase of the initial concentration of BSA and chitosan. A high capacity of BSA accelerated the release of the BSA of the NPs, while adding PEG challenged the encapsulation of BSA and accelerated the release rate. The authors concluded that molecular and chitosan NP formation parameters play an important role in the release of the protein, while making it possible to modulate relative parameters in order to satisfy the protein delivery needs [50].

Deng et al. [2] used chitosan NPs loaded with lysozyme prepared by ionotropic gelation, obtaining NPs that were 50–280 nm in diameter. This work focused on the MW of chitosan, encapsulation efficiency, loading capacity, rate of release, and lysozyme activity in the chitosan NPs.

Tea polyphenol-loaded chitosan NPs showed a branch shape and heterogeneous distribution in prepared suspension, and transmission electron microscope images showed in which the HepG2 cells treated with these NPs exhibited some typical apoptotic features, such as microvilli disappearance, margination of nuclear chromatin, intracytoplasmic vacuoles, and mitochondrial swelling. In addition, the tea polyphenol-loaded chitosan NPs had relatively weak inhibitory effects on HepG2 cancer cells compared with tea polyphenols [51].

As can be seen, several studies examine the development of chitosan NPs and bioactive compounds. However, most of them are focused on the use of chitosan matrices for the controlled release of an active compound, mainly determining its rate of delivery and mostly directed to the area of pharmacology.

Essential oils, aromatic oily liquids that can be obtained from several parts of the plants, are known for their medicinal properties, mainly antimicrobial. Because these compounds can easily undergo oxidation reactions

that result in allergenic products and/or products with less biological activity, the nanoencapsulation of these oils in drug delivery systems in chitosan-based NPs formulations may be used to significantly improve the essential oil antimicrobial activity.

CONCLUDING REMARKS

The benefits and potential uses of nanotechnology are enormous. Nanotechnology enables plants to use water, pesticides, and fertilizers more efficiently. Also, their use may bring potential benefits to farmers, allowing them to innovate in the food industry via development of new products, preservation, and packaging.

Nanotechnology promises a breakthrough in improving our presently abysmal nutrient use efficiency through nanoformulation of fertilizers, breaking yield and nutritional quality barriers through bionanotechnology, surveillance, and control of pests and diseases, understanding the mechanism of host-parasite interactions at the molecular scale, development of new-generation pesticides and safe carriers, preservation and packaging of food and food additives, nanocapsules for agrochemical delivery, antimicrobial nanoemulsions for applications in decontamination of food, and improving the shelf life of vegetables and flowers, among others. Nanotechnology requires a thorough understanding of science, as well as fabrication and material technology in conjunction with knowledge of the agricultural production system. Applications in agriculture might take a few decades to move from laboratory to land.

Multidisciplinary approaches could potentially improve food production, incorporating emerging technologies and disciplines such as chemical biology integrated with nanotechnologies to tackle existing biological bottlenecks that currently limit further developments. The potential benefits of nanotechnology for agriculture, food, fisheries, and aquaculture need to be balanced against concerns for the soil, water, environment, and the occupational health of workers.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT) through Grant No. 219786 and the graduate scholarship granted to Cynthia Nazareth Hernández-Téllez, MSc. To the Universidad de Sonora through Grant No. USO313000203.

REFERENCES

- [1] E.M. Camacho, B.J. Vega, G.A. Campos, Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias, *Rev. Soc. Quim. Perú* 77 (4) (2011) 292–306.
- [2] Q. Deng, C. Zhou, B. Luo, Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme, *Pharm. Biol.* 44 (5) (2006) 336–342.
- [3] A. Piras, G. Maisetta, S. Sandreschi, S. Esin, M. Gazzarri, G. Batoni, F. Chiellini, Preparation, physical–chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme, *Int. J. Biol. Macromol.* 67 (2014) 124–131.
- [4] K. Derakhshandeh, S. Fathi, Role of chitosan nanoparticles in the oral absorption of Gemcitabine, *Int. J. Pharm.* 437 (2012) 172–177.
- [5] C. Cai, U. Bakowsky, E. Rytting, A. Schaper, T. Kissel, Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 31–42.
- [6] J. Weiss, P. Takhistov, D.J. McClements, Functional materials in food nanotechnology, *J. Food Sci.* 71 (9) (2006) 107–116.
- [7] B.S. Sekhon, Nanotechnology in agri–food production: an overview, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 7 (2014) 31–53.
- [8] O. Cota-Arriola, M.O. Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández, J.M. Ezquerra-Brauer, M. Plascencia-Jatomea, Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture, *J. Sci. Food Agric.* 93 (2013) 1525–1536.
- [9] S.S. Mukhopadhyay, Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 7 (2014) 63–71.
- [10] M. Plascencia-Jatomea, J.M. Velez-Haro, F.A. Moreno-Villa, Quitina y sus derivados a partir de los subproductos de la pesca, in: Josafat Marina, Ezquerra Brauer (Eds.), *Química, bioquímica y estructura de los subproductos de la pesca*, Universidad de Sonora Editorial, México, DF, 2014, pp. 397–425.
- [11] K. Se-Kwon, Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications, CRC Press, Boca Raton, FL, 2010.
- [12] S.Z. Rogovina, C.V. Alexanyan, E.V. Prut, Biodegradable blends based of chitin and chitosan: production, structure and properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 121 (2010) 1850–1859.
- [13] H.M.C. de Azeredo, Nanocomposites for food packaging applications, *Food Res. Int.* 42 (2009) 1240–1253.
- [14] K. Kean, M. Thanou, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 3–11.
- [15] P. Mukhopadhyay, B. Bhattacharya, A. Nandy, A. Bhattacharyya, R. Mishrab, P.P. Kundu, Assessment of *in vivo* chronic toxicity of chitosan and its derivatives used as oral insulin carriers, *Toxicol. Res.* 4 (2015) 281–290.
- [16] M.A. Elgadir, M.S. Uddin, S. Ferdous, A. Adam, C.A.J. Khan, S.M.Z. Islam, Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: a review, *J. Food Drug Anal.* 22 (2014) 1–111.
- [17] A.P. Martínez-Camacho, M.O. Cortez-Rocha, M.M. Castillo-Ortega, A. Burgos-Hernández, J.M. Ezquerra-Brauer, M. Plascencia-Jatomea, Antimicrobial activity of chitosan nanofibers obtained by electrospinning, *Polym. Int.* 60 (2011) 1663–1669.
- [18] J. Palma-Guerrero, J.A. López-Jiménez, A.J. Pérez-Berná, I.C. Huang, H.B. Jansson, J. Salinas, J. Villalán, N.D. Read, L.V. Lopez-Llorca, Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan, *Mol. Microbiol.* 75 (2010) 1021–1032.
- [19] A. El Hadrami, R.L. Adam, I. El Hadrami, F. Daayf, Chitosan in plant protection, *Mar. Drugs* 8 (2010) 968–987.
- [20] M. Kong, C.X. Guang, K. Xing, P.H. Jin, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *Int. J. Food Microbiol.* 144 (2010) 51–63.

- [21] M. Plascencia-Jatomea, M.S. Yépez-Gómez, J.M. Velez-Haro, Chapter 8: *Aspergillus* spp. (Black mold), in: S. Bautista-Baños (Ed.), Postharvest Decay: Control Strategies, Elsevier Inc., 2014, pp. 267–286.
- [22] O. Cota-Arriola, M.O. Cortez-Rocha, E.C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, Y.L. López-Franco, M. Plascencia-Jatomea, Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1, *Polym. Int.* 60 (2011) 937–944.
- [23] O. Cota-Arriola, M.O. Cortez-Rocha, J.M. Ezquerro-Brauer, J. Lizardi-Mendoza, A. Burgos-Hernández, R.M. Robles-Sánchez, Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium triphosphate, *J. Polym. Environ.* 21 (2013) 971–980.
- [24] S.H. Hsu, Y.B. Chang, C.L. Tsai, K.Y. Fu, S.H. Wang, H.J. Tseng, Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 85 (2011) 198–206.
- [25] A. Arora, G.W. Padua, Review: nanocomposites in food packaging, *J. Food Sci.* 75 (2010) 43–49.
- [26] J.-W. Rhim, H.-M. Park, C.-S. Ha, Bio-nanocomposites for food packaging applications, *Prog. Polym. Sci.* 38 (2013) 1629–1652.
- [27] R. Foldbjerg, D. Dang, H. Autrup, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 743–750.
- [28] S.K. Shukla, A.K. Mishra, O.A. Arotiba, B.B. Mamba, Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review, *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 46–58.
- [29] A.V. Il'ina, V.P. Varlamov, A.E. Yu, V.N. Orlov, K.G. Skryabin, Chitosan is a natural polymer for constructing nanoparticles, *Chemistry* 421 (2008) 165–167.
- [30] N. Sanpo, S. Ming, P. Cheang, K.A. Khor, Antibacterial property of cold sprayed chitosan Cu/Al coating, *J. Therm. Spray Technol.* 18 (2009) 600–608.
- [31] B. Perlatti, P.L. de Souza, M.F.G. Fernandes da Silva, J.B. Fernandes, M.R. Forim, Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals, in: S. Tirdan (Ed.), *Insecticides – Development of Safer and More Effective Technologies*, InTech, Rijeka, Croatia, 2013.
- [32] H. Tokumitsu, H. Ichikawa, Y. Fukumori, Chitosan-gadolinium pentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1830–1835.
- [33] S. Agnihotri, N. Mallikarjuna, T. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release* 100 (2004) 5–28.
- [34] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (2005) 67–75.
- [35] A. Luque-Alcaraz, J. Lizardi, F. Goycoolea, M. Valdez, A. Acosta, S. Iloki-Assanga, I. Higuera-Ciajara, W. Argüelles-Monal, Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 1–7.
- [36] M. Cushen, J. Kerry, M. Morris, M. Cruz-Romero, E. Cummins, Nanotechnologies in the food industry – recent developments, risks and regulation, *Trends Food Sci. Technol.* 24 (1) (2012) 30–46.
- [37] D. Mateo, P. Morales, A. Ávalos, A. Haza, Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad *in vitro*, *Acta Toxicol. Argent.* 21 (2) (2013) 102–109.
- [38] P. Opanasopit, P. Aumklad, J. Kowapradit, T. Ngawhiranpat, A. Apirakaramwong, T. Rojanarata, S. Puttipatkhachorn, Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on *in vitro* permeability enhancement in intestinal epithelial cells (CACO-2), *Pharm. Dev. Technol.* 12 (2007) 447–455.
- [39] S.Y. Chae, M.K. Jang, J.W. Nah, Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans, *J. Control. Release* 102 (2005) 383–394.

- [40] B. Carreño-Gomez, R. Duncan, Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.* 148 (1997) 231–240.
- [41] J. Pae, P. Säälk, L. Liivamägi, D. Lubenets, P. Arukuusk, Ü. Langel, M. Pooga, Translocation of cell-penetrating peptides across the plasma membrane is controlled by cholesterol and microenvironment created by membranous proteins, *J. Control. Release* 192 (2014) 103–113.
- [42] Y.-L. Hu, W. Qi, F. Han, J.-Z. Shao, J.Q. Gao, Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model, *Int. J. Nanomed.* 6 (2011) 3351–3359.
- [43] P.J.A. Borm, D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit, E. Oberdorster, The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC, *Part Fibre Toxicol.* 3 (2006) 11.
- [44] L.Y. Ing, N.M. Zin, A. Sarwar, H. Katas, Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties, *Int. J. Biomat.* 2012 (2012) 1–9 Article ID 632698.
- [45] L.C. Chen, S.K. Kung, H.H. Chen, S.B. Lin, Evaluation of zeta potential difference as an indicator for antibacterial strength of low molecular weight chitosan, *Carbohydr. Polym.* 82 (3) (2010) 913–919.
- [46] C. You, C. Han, X. Wang, Y. Zheng, Q. Li, X. Hu, H. Sun, The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity, *Mol. Biol. Reports* 39 (9) (2012) 9193–9201.
- [47] Z. Ma, L.Y. Lim, Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 20 (11) (2003) 1812–1819.
- [48] M. Leitgeb, K. Herzic, G. Podrepsek, A. Hojski, A. Crnjac, Z. Knez, Toxicity of magnetic chitosan micro and nanoparticles as carriers for biologically active substances, *Acta Chim. Slov.* 61 (2014) 145–152.
- [49] A. Pinheiro, A. Bourbon, B. Medeiros, L. Silva, M. Silva, M. Carneiro-da-Cunha, M. Coimbra, A. Vicente, K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16 (2012) 227–232.
- [50] Y. Xu, Y. Du, Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 215–226.
- [51] J. Liang, F. Li, Y. Fang, W. Yang, X. An, L. Zhao, Z. Xin, L. Cao, Q. Hu, Cytotoxicity and apoptotic effects of tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles on human hepatoma HepG2 cells, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 36 (2014) 7–13.

CAPÍTULO 2. Efecto antifúngico de las nanopartículas de quitosano-lisozima elaboradas por nanoprecipitación, sobre la viabilidad, germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus* y la producción de β -1,3 glucanasas

Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and b-1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*

Hernández-Téllez, C. N., Rodríguez-Córdova, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Cortez Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., Plascencia-Jatomea, M. (2017). Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1, 3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech*, 7(5), 279. DOI 10.1007/s13205-017-0913-4

Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*

Cynthia Nazareth Hernández-Téllez¹ · Francisco Julián Rodríguez-Córdova¹ · Ema Carina Rosas-Burgos¹ · Mario Onofre Cortez-Rocha¹ · Armando Burgos-Hernández¹ · Jaime Lizardi-Mendoza² · Wilfrido Torres-Arreola¹ · Aarón Martínez-Higuera¹ · Maribel Plascencia-Jatomea¹

Received: 6 May 2017 / Accepted: 2 August 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Synthesis of nanocomposites from antimicrobial biopolymers such as chitosan (CS) and lysozyme (LZ) is an important and promising area in bionanotechnology. Chitosan–lysozyme (CS–LZ) nanoparticles (NPs) were prepared by the nanoprecipitation method, using commercial chitosan of 153 kDa. TEM and dynamic light scattering (DLS) analysis were carried out to evaluate the morphology, size, dispersion, and Z potential. Association efficiency of lysozyme was determined using Coomassie blue

assay. The antifungal activity of NPs against *Aspergillus parasiticus* was evaluated through cell viability (XTT), germination and morphometry of spores, and reducing sugars production; the effects on membrane integrity and cell wall were also analyzed. NPs' size were found in the range of 13.4 and 11.8 nm for CS–LZ and CS NPs, respectively, and high Z potential value was observed in both NPs. Also, high association of lysozyme was presented in the CS matrix. With respect to the biological responses, CS–LZ NPs reduced the viability of *A. parasiticus* and a strong inhibitory effect on the germination of spores (100% of inhibition) was observed at 24 h in vitro assays. CS–LZ and CS NPs affected the membrane integrity and the cell wall of spores of fungi with respect to control, which is consistent with the low amount of reducing sugars detected. CS–LZ NPs prepared by nanoprecipitation promise to be a viable and safe alternative for use in biological systems, with a possible low or null impact to humans and biota. However, the potential benefits and the environmental and health implications of NPs need to be globally discussed due to its possible negative effects.

Keywords Chitosan–lysozyme · Nanoparticles · Cell viability · Morphometry · *Aspergillus parasiticus* · Membrane integrity · Cell wall · β -1,3-Glucanase

Abbreviations

CS–LZ	Chitosan–lysozyme
NPs	Nanoparticles
CS	Chitosan
LZ	Lysozyme
TEM	Transmission electron microscopy

✉ Maribel Plascencia-Jatomea
mplascencia@guayacan.uson.mx
Cynthia Nazareth Hernández-Téllez
naza08qb@gmail.com
Francisco Julián Rodríguez-Córdova
julianrc15@gmail.com
Ema Carina Rosas-Burgos
ecosas@guayacan.uson.mx
Mario Onofre Cortez-Rocha
mcortez@guayacan.uson.mx
Armando Burgos-Hernández
armando.burgos@unison.mx
Jaime Lizardi-Mendoza
jalim@ciad.mx
Wilfrido Torres-Arreola
wilfrido.torres@unison.mx
Aarón Martínez-Higuera
zar_aron@hotmail.com

¹ Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

² Laboratorio de Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, Hermosillo, Sonora, Mexico



DLS	Dynamic light scattering
XTT	Tetrazolium salt
Mw	Molecular weight
ROS	Reactive oxygen species
kDa	Kilo Daltons
PDA	Potato dextrose agar
µg/mL	Microgram per milliliter
BSA	Bovine serum albumin
PI	Propidium iodide
CW	Calcofluor-white
CS	Chitosan of 153 kDa

Introduction

Nanostructured systems constitute an increasingly important nanometric scale type of products, whose use has been significant in the last decade. Recent progress in nanotechnology provides improvements in processing, designs, and manufacturing systems (Camacho Elizondo et al. 2011), and nanocomposites are an emergent class of nanostructured hybrid materials composed of a natural polymer and an inorganic solid and, on minimum, one of its components possesses one nanometric scale dimension. These materials exhibit improved structural and functional properties for different applications, such as high performance and low weight (Patel et al. 2015). The nanostructured materials (i.e., nanoparticles, nanotubes) possess very particular characteristics, such as the ability to cross cell membranes due to their size, besides showing a large area/surface ratio and therefore a large superficial extension and high reactivity or functionality (Rhim et al. 2013). Due to these intrinsic properties, nanoparticles may be toxic, which can be associated with cellular damages caused by their bioaccumulation as a result of exposure, besides changes in biological activities including ROS generation (Manke et al. 2013). However, taking into account the environmental hazards, research has been focused on green nanotechnology, where biopolymers such as polysaccharides play diverse roles.

At the present time, the use of biodegradable polymers in nanocomposite technology has received special attention. These materials, called “bionanocomposites”, combine an interdisciplinary research based on materials science, nanotechnology, and biological science, which can lead to the development of bionanocomposites with drug delivery systems (Wang et al. 2016; Zhang et al. 2015) or environment-friendly applications (Ojijo and Ray 2013). Formulation of functional biopolymers, such as chitosan, into nanoparticles significantly increases its antimicrobial effect; therefore, it is feasible that these particles have the

potential of becoming a promising, safe, and natural alternative for the control of microorganisms (Cota-Arriola et al. 2013a; El Guilli et al. 2016; Yien et al. 2012).

The production of nanocomposites, made from antimicrobial natural polymers with bioactive compounds such as chitosan and lysozyme, is an interesting topic in the development of functional bio-based materials for biotechnological applications. Several studies have focused on the application of bionanocomposites in the human medicine area, as they have been associated with properties such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anticancer, and antidiabetic activity, cholesterol lowering effect, and mats for pork preservation (Cota-Arriola et al. 2013b; Huang et al. 2012; Lin et al. 2007; Durango et al. 2006; Park et al. 2004; Hirano et al. 1990).

The antimicrobial effect of chitosan-based nanomaterials has been previously reported. Chitosan nanoparticles (NPs) exhibit a better inhibitory activity against fungi like *Candida albicans* and *Fusarium solani* compared to chitosan in solution, and the inhibitory effect was influenced by size and Z potential of NPs (Yien et al. 2012). In a previous work, a better in vitro antifungal effect of chitosan NPs against *A. parasiticus* spores was observed (Cota-Arriola et al. 2013a). Similarly, layer-by-layer structured nanocomposites of lysozyme/chitosan/organic rectorite enhanced the degree of inhibition against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, extending the shelf life of pork for about 3 days (Huang et al. 2012). The antimicrobial activity of chitosan can be increased by enzymatic changes of the native chemical conformation of the biopolymer by using lysozyme, a non-specific enzyme that can be effortlessly obtained at low cost production. The enzyme catalyzes the hydrolysis of β -(1,4) glycosidic linkages between *N*-acetyl-D-glucosamine and *N*-acetylmuramic acid in polysaccharides from bacteria and chitosan (Zimoch-Korzycka et al. 2015), hence cutting down the molecular weight until fragments of very low molecular weight of chitoooligomers are produced (Ren et al. 2005).

Chitoooligomers display better antimicrobial activity compared to chitosan. For example, a high inhibition of *Listeria monocytogenes* growth was observed with chitoooligomers of insoluble fractions obtained from enzymatic hydrolysis with lysozyme, compared to water-soluble fractions or chitosan (Zimoch-Korzycka et al. 2015). In addition to the chitoooligomers production, the incorporation of lysozyme into chitosan-based formulations has proved to be an option to obtain coatings with antibacterial activity. Active coatings of chitosan–lysozyme effectively inhibited the growth of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*, which demonstrates the potential of using this material for antimicrobial packaging (Lian et al. 2012).

Also, coating solutions of lysozyme–chitosan increased the shelf life of chicken eggs during storage and delayed



the loss of interior quality (Yuceer and Caner 2014). Chitosan nanomaterials loaded with lysozyme are biodegradable and biocompatible, with a potential for using it as wound dressings. In these materials, the amount of lysozyme loaded in the nanomaterial matrix decreases when the initial concentration of lysozyme increases (Charernsriwilaiwat et al. 2012).

Regarding the antimicrobial effect, chitosan NPs loaded with lysozyme preserve the antibacterial activity of the loaded enzyme against *S. epidermidis* up to 5 days of incubation and a slow release over 3 weeks in vitro was observed (Piras et al. 2014). Despite the enhanced antimicrobial potential that can result from the combination of chitosan and lysozyme in the form of nanoparticles, there is not enough information related to the effect of these materials on the spore viability and growth of phytopathogenic fungi of agronomic importance.

The objectives of this research work were: (a) to synthesize nanoparticles from chitosan–lysozyme solutions and to study its physicochemical properties, (b) to evaluate the antifungal effect on the viability, germination and morphometry of *A. parasiticus* spores and (c) to determine the effect on the membrane integrity and β -1,3-glucanase production quantified as reducing sugar production by fungi.

Materials and methods

Materials

Commercial chitosan flakes with medium molecular weight (153 kDa, 78% deacetylation degree, Aldrich cat. 448,877) were used. Commercial lysozyme from chicken egg white (lyophilized powder, protein $\geq 90\%$, $\geq 40,000$ units/mg protein, cat. L6876) was purchased from Sigma-Aldrich Co.

Strains and microorganisms cultures

Single spore cultures of *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16,992) were prepared and maintained in potato dextrose agar media (PDA, Bioxon, USA) at 4 °C until their use (Xu et al. 2013).

Preparation of the chitosan–lysozyme nanoparticles

Nanoparticles (NPs) were prepared according to the nanoprecipitation technique (Luque-Alcaraz et al. 2012; Bilati et al. 2005). A chitosan–lysozyme (CS–LZ) solution, 1:1 (w/w) proportion, was used as diffuse phase and absolute acetone was used as disperse phase. The diffuse phase was prepared at a concentration of 0.5 mg/mL (w/v)

by dissolving 0.05 g of chitosan flakes in 100 mL of 1% (v/v) acetic acid solution. Then, the lysozyme was added at a concentration of 0.5 mg/mL (w/v) by dissolving 0.05 g of enzyme in the chitosan solution previously prepared. The CS–LZ solution was maintained under magnetic stirring at 500 rpm for 5 min and aliquots of 2.5 mL were directly dropped into a glass beaker containing 40 mL of absolute acetone and Tween 80 (0.05% v/v). The flux was set at 0.87 mL/min using a peristaltic pump (BIO-RAD, USA). Chitosan (CS) nanoparticles, prepared from a solution containing 0.5 mg/mL (w/v) (diffuse phase), were used as a control. The newly formed NPs were used for the characterization and subsequent trials.

Physicochemical characterization of nanoparticles

Morphology

The morphology of the CS–LZ nanoparticles was observed in a transmission electron microscope (TEM) (JEM 2010F JEOL, USA). A drop of sample was allowed to dry at room temperature in a carbon-coated film on a 400-mesh copper grid (FCF400-Cu) in a vacuum chamber for 18 h. Subsequently, observations were made in the field of 200 nm. The acceleration voltage used for the TEM observations was 200 kV.

Size, dispersion, and Z potential

Size, dispersion, and Z potential of NPs were determined by dynamic light scattering (DLS) analysis using a Mobius equipment (Wyatt Technologies, USA), at a controlled temperature. The system uses a single laser Mobius, longitudinal mode of 45 mW, operated at 532 nm and a scattering angle of $\theta = 163.5^\circ$. The analysis of the experimental data was carried out using the Dynamics 7.3.1.15 software (Wyatt Technology Corporation, USA).

Association efficiency of lysozyme

The amount of lysozyme attached to the nanoparticles was determined measuring the difference of weight between that of total lysozyme added to the diffuse phase and that of lysozyme contained in the supernatant (non-attached). Samples were centrifuged at 8500 rpm for 20 min and the association efficiency of nanoparticles was determined. A 100 μ L aliquot of supernatant was combined with 900 μ L of G-250 Coomassie blue stain solution, and this mixture was incubated during 5 min to allow protein staining. Absorbance of this mixture was measured in triplicate at 595 nm using a spectrophotometer (ELISA, Termolabsystem, China) (Zhang et al. 2013). A standard curve

($R^2 = 0.9561$) was prepared using a lysozyme solution (at concentrations of 50–300 $\mu\text{g/mL}$) in 1% (v/v) acetic acid solution. The association efficiency of lysozyme to chitosan in the nanoparticles was defined as the percentage of the associated lysozyme and was calculated using Eq. (1) (Luque-Alcaraz et al. 2012):

$$\text{Association efficiency (\%)} = \left[\frac{(\text{totally lysozyme} - \text{linked lysozyme})}{\text{totally lysozyme}} \right] \times 100. \quad (1)$$

Biological characterization of nanoparticles

Effect on the viability of *Aspergillus parasiticus*

The colorimetric assay using tetrazolium salt XTT [2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide] for the quantification of the number of viable spores was carried out. Menadione was used as an electron-coupling agent (Meletiadiis et al. 2001). A spore suspension containing 4×10^6 spores/mL was used as an inoculum (Luque-Alcaraz et al. 2016; Meletiadiis et al. 2001).

The assays were carried out using 96-well microplates. A 100 μL aliquots of the spore suspension was added to each well and incubated for 4 h at 27 ± 2 °C. Then, 100 μL of nanoparticles (CS, CS-LZ) or lysozyme solution at different concentrations were added, to achieve final concentrations (at the well) of 300, 250, 200, 150, 100, and 50 $\mu\text{g/mL}$. Microplates were incubated for another 4 h at the same temperature. Finally, 57.06 μL of the XTT–menadione solution was added to each well and samples were again incubated for 3 h. The absorbance was measured in triplicate at 450 nm in a spectrophotometer (ELISA, Termolabsystem, China). Sterile Czapek liquid medium was used as control. From the obtained experimental data, the concentration of nanoparticles that inhibited 50% of the spore viability (IC_{50}) was determined by Probit analysis using the NCSS statistical program (NCSS Inc., USA). The estimated IC_{50} values were used for subsequent antifungal assays.

Effect on the germination of *Aspergillus parasiticus* spores

A 700 μL aliquot of Czapek liquid medium was inoculated into the spore suspension mentioned above, to obtain a final concentration of 2×10^6 spores/mL and was deposited on flat-bottom wells of a microtiter plate (Costar, Corning, USA), previously conditioned with a sterile glass coverslip in each well. Then, 300 μL of either CS-LZ NPs or CS NPs suspension was added and homogenized. Plates were

incubated (Nova-Tech, USA) for 24 h at 27 ± 2 °C. Finally, coverslips with the adhered cells were removed and 200 spores per coverslip (germinated and non-germinated) were randomly counted using an optical microscope (Olympus CX-311, Japan). The percentage of inhibition with respect to the control was calculated (Plascencia-Jatomea et al. 2003).

Morphometric analysis of spores

The effect of nanoparticles on the average diameter of the fungi spores was determined by image analysis using Image-Pro Plus version 6.3 software (Media Cybernetics Inc., USA). Images from the spore germination assay were captured using an optical microscope (Olympus CX31, Japan) connected to an Infinity 1 camera (Media Cybernetics, USA). At least 60 measurements per treatment were made using the 40 \times objective (Luque-Alcaraz et al. 2016; Cota-Arriola et al. 2016; Cota-Arriola et al. 2013a).

β -1,3-Glucanases enzymatic assay

β -1,3-Glucanase extracts were prepared in flasks containing 20 mL of Czapek broth, which were separately inoculated with 1×10^5 spores/mL of *A. parasiticus* and incubated for 96 h at 28 °C. The cultures were centrifuged, sonicated, and the supernatants were obtained following the procedure reported (Buitimea-Cantúa et al. 2013).

The effect of either CS nanoparticles or CS-LZ BNCs on the β -1,3-glucanase activity of *A. parasiticus* was determined by the production of reducing sugars, using 12 μL of the supernatant, 125 μL of laminarin 2.5% as substrate (Sigma-Aldrich, USA), 10 μL of bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich), and 362 μL of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2. The mixture was incubated for 25 min at 37 °C and reducing sugars were estimated at 610 nm following the Somogyi–Nelson method using a standard curve of glucose (Buitimea-Cantúa et al. 2013).

Effect on *Aspergillus parasiticus* membrane and cell wall integrity

An inverted fluorescence microscope (Leica DMi8, USA), equipped with a 50 W Hg lamp and a filter set (DAPI excitation 350/50 and emission 460/50, FITC excitation 480/40 and emission 527/30, RHOD excitation 546/10 and emission 585/40), was used. The digital images were acquired with a DFC 450C camera (Leica Microsystem, USA) and a fluorescence overlay software (LAS AF version 3.1.0, Leica Microsystem, USA) for image acquisition and management. Cultures were prepared under the same conditions used in the spore germination probes and the

glass coverslips with the fungi grown during 24 h were stained with the fluorescent biomarkers.

Damage or permeability of fungal membrane after exposure to NPs was observed using propidium iodide PI (Sigma, USA), a membrane-impermeable dye. The fungi was stained with a 3 μ M PI solution and incubated for 3–6 h at 28 °C. Cells were visualized using a fluorescence microscope (Chavan and Tupe 2014; Riccardi and Nicoletti 2006). The effect of CS and CS–LZ nanoparticles on cellulose and chitin contained in fungi cell wall and septa was analyzed using the fluorescent stain calcofluor-white (Fluorostain I, Sigma, USA). Fungi were stained with two drops of a solution containing 10 μ g/mL of fluorochrome, incubated for 30 min at room temperature, and observed under the fluorescence microscope (Medina-López et al. 2016).

Statistical analysis

Statistical analysis (one-way analysis of variance) on a completely randomized design was performed using the JMP software (version 10.0.0, SAS Institute Inc.). Means for groups in homogeneous subsets were carried out using the Tukey multiple comparisons test (Tukey's post hoc test) at a 95% confidence interval. All data were presented as the mean value with their indicated standard error (mean \pm SE). The significance level was set at 0.05. Probit analysis was performed using the NCSS software (version 2001, NCSS Statistical Software, USA).

Results and discussion

Physicochemical characterization of nanoparticles

Morphology

The CS–LZ nanoparticles obtained by nanoprecipitation showed a defined spherical and regular structure, with average diameter between 15 and 30 nm (Fig. 1). Some

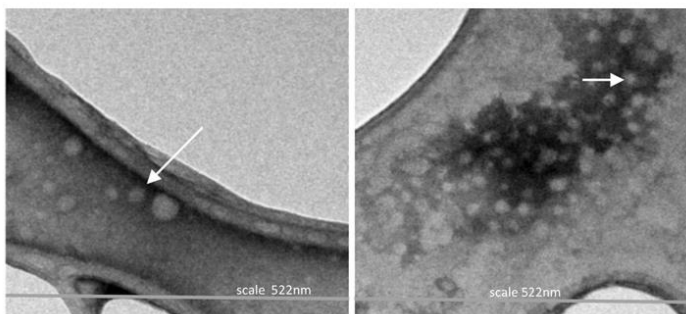
authors who have used the same nanoprecipitation method (Luque-Alcaraz et al. 2012) and ionotropic gelation (Piras et al. 2014) have reported obtaining chitosan nanoparticles with size about 280–500 and 140–159 nm, respectively, which may vary depending on chitosan molecular weight, solvent employed, and the bioactive compound associated with the nanomaterial matrix. The CS–LZ nanoparticles diameter obtained in this study were smaller than those reported by Luque-Alcaraz et al. (2012) and Piras et al. (2014); however, the shape was similar.

Size, dispersion, and Z potential

Figure 2 shows the size distribution determined by dynamic light scattering (DLS) analysis of the CS and CS–LZ NPs prepared with chitosan of 153 kDa. The average size was 13.4 nm and 11.8 nm for the CS and CS–LZ NPs, respectively, and a bimodal distribution was observed (Table 2). Regardless of the lysozyme loaded, the CS–LZ NPs showed a slight size reduction compared to CS nanoparticles; however, based on the statistics results, both NPs did not showed significant differences. The lower distribution of the average sizes might be related to a shorter length of the CS chains, favoring the formation of three-dimensional networks. A population of particles with larger diameter was observed at significantly lower intensity.

The size of the NPs obtained by the nanoprecipitation method was significantly smaller compared to that of lysozyme-loaded CS nanoparticles prepared by ionotropic gelation with TPP (Piras et al. 2014). Besides the elaboration method, other factors, such as CS concentration, CS–protein weight ratio, CS deacetylation degree, and pH of solution, could have an influence on the particle size (Deng Q-y et al. 2006; Yien et al. 2012). Moreover, it has been suggested that when the molecular weight of chitosan is low, there is a greater flexibility of the biopolymer chains and a quicker formation of bridges between bacterial cells and polymeric chains, leading to a strong *in vitro*

Fig. 1 TEM images of chitosan–lysozyme (CS–LZ) nanoparticles. Scale of image: 522 nm. Asterisk samples of NPs were fixed on a carbon-coated film on a 400 mesh copper grid (FCF400-Cu)



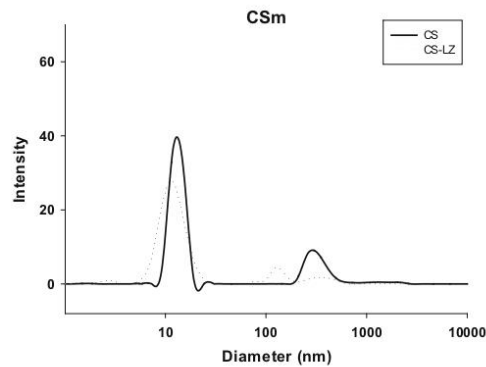


Fig. 2 Size distribution of chitosan (CS) and chitosan-lysozyme (CS-LZ) nanoparticles, obtained by dynamic light scattering (DLS) analysis

Table 1 Size and Z potential of chitosan and chitosan-lysozyme nanoparticles

Chitosan (153 kDa)	Size (nm)	Z potential (mV)
CS	13.4 ± 6.3; 295.8	+34.9 ± 4.0
CS-LZ	11.8 ± 5.1; 127.1	+33.5 ± 2.0

Data, followed by their standard errors, are means of ten experiments

bactericidal effect against *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Prevotella melaninogenica*, and *Bacteroides fragilis* (Benhabiles et al. 2012). Also, the growth and spores germination of fungi such as *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* were inhibited by chitoooligomers (Rahman et al. 2015).

The Z potential of all NPs was positive (Table 1), which suggests that nanoparticles prepared by nanoprecipitation may have greater stability in suspension as a result of repulsive forces, avoiding crowds and precipitation of material. The surface charge could be attributed to the presence of the chitosan amino groups ($-\text{NH}_2$) on the particle surface, associated with the polycationic character of the biopolymer (pH 4.5). The authors suggest that portions of the positively charged lysozyme (pH 6.6) can be adsorbed onto the CS-LZ nanoparticle surface (Piras et al. 2014).

Association efficiency of lysozyme

The percentage of association between the lysozyme and chitosan in the CS-LZ nanoparticles matrix was indirectly determined by quantification of the amount of non-linked lysozyme (free lysozyme). Nanoparticles showed a high

($P < 0.05$) association value ($77.6 \pm 6.5\%$) of lysozyme on the chitosan matrix. These results confirm the enzyme entrapment in the NPs matrix, which could be reversible at neutral pH at 25 °C and release the lysozyme to the media. The association value obtained in this study was significantly higher than those reported by Piras et al. (2014) and Deng et al. (2006) for the CS-LZ matrixes (8.3–35.0% of association of lysozyme) obtained by ionotropic gelation (Deng et al. 2006). It has been reported that ionic interactions between the enzyme and the chitosan as support provide less leaching and a high entrapment of the compound due to its hydrophilic nature (Datta et al. 2013).

The elaboration method of NPs is one factor that can affect the association capacity. It is feasible that the chemical cross-linking between chitosan and tripolyphosphate (TPP, used in ionic gelation techniques) leads to a major rigidity of nanoparticles and therefore to a major stability of the polymeric matrix. However, if the matrix is chemically more stable, a weaker association of lysozyme in the CS-LZ-TPP complex can occur; therefore, these nanoparticles produced by the nanoprecipitation method could associate higher quantity of lysozyme to the matrix, which does not involve the use of cross-linking agents. However, particles with strong gelation and hydrogen bonds can be obtained when TPP and chitosan with high % DD are used, due to the high amount of chitosan amino groups linked to tripolyphosphate groups (Xu and Du 2003).

The authors suggest that the coacervation of chitosan (of high Mw) particles increases the rigidity and package of chains due to inter and intramolecular interactions, resulting in a minor permeability of the particle membrane surface, which can also affect the release rate of the encapsulated compound. Besides, chitosan molecules with extended lineal chain conformations are more flexible, entangle easier and form more intermolecular hydrogen bonding, hydrophobic interaction and electrostatic interaction, which leads to an increase in the surface tension; moreover, for the high molecular weight chitosans, the increase of surface tension is more prominent than that of low molecular weight chitosans (Qun and Ajun 2006).

Considering the above, it is possible that CS chains induced the formation of more compact molecular conformations and/or three-dimensional networks due to a compacted molecular arrangement in the diffuse phase, reducing the surface tension and allowing greater association with the lysozyme.

Biological characterization of nanoparticles

Effect on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores

The antimicrobial effect of chitosan, biologically active chitoooligomers and chitosan nanoparticles has been

demonstrated, mainly in bacterial species. Chitoooligomers have been effective against Gram-positive bacteria, such as *Listeria monocytogenes* (Zimoch-Korzycka et al. 2015), *S. aureus*, *B. subtilis*, and *B. cereus*; Gram-negative bacteria like *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* and *V. cholera* (Benhabiles et al. 2012); and filamentous fungi such as *B. cinerea* and *M. piriformis* (Rahman et al. 2015). In fungi, the plasma membrane has been reported as the main chitosan target and the cell wall composition plays an important role in the sensitivity of filamentous fungi such as *Neurospora crassa* and *Pochonia chlamydosporia* (Aranda-Martinez et al. 2016).

Regarding the antifungal activity of chitosan nanomaterials, a better inhibitory activity against *Candida albicans* and *Fusarium solani* was reported for CS NPs prepared by ionic gelation from different concentrations of low and high molecular weight compared to the solution form. *Aspergillus niger* was found to be resistant to chitosan NPs except for those prepared from higher concentrations of high molecular weight chitosan, and the inhibitory effect was influenced by particle size and Z potential of CS NPs (Yien et al. 2012).

In this work, the XTT method was used to evaluate the antifungal effect of the chitosan-lysozyme NPs on the spore viability of *A. parasiticus*. The results showed that lysozyme had a moderate effect on the viability of fungal spores and around 60% of viable spores were detected at the highest concentration tested (250 and 300 µg/mL). A higher spore viability (>80%) was observed when the concentration of lysozyme decreased (Fig. 3).

Since *Aspergillus* species are widely distributed in nature and are able to grow in a variety of substrates or environments such as humans, animals, soil, plants, decaying organic matter, and stored food such as grains (Plascencia-Jatomea et al. 2014), the results suggests that *A. parasiticus* exhibit a low sensitivity to lysozyme that could be associated with its ability to assimilate low protein concentrations as carbon and nitrogen sources.

Some lysozymes can kill bacteria by stimulating autolysin activity upon interaction with the cell surface and extensive hydrolysis of peptidoglycan by lysozyme results in cell lysis and death in a hypo-osmotic environment (Salazar and Asenjo 2007). In fungi, lysozyme isolated from mungbean seeds (*Phaseolus mungo*) showed strong activity toward *Fusarium oxysporum*, and some activity toward *F. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium aphanidermatum*, and *B. cinerea*; however, it had hardly any antifungal effect on *Mycosphaerella arachidicola* (Wang et al. 2005). Also, the inhibitory activity of lysozyme (from hen egg white) against 18 phytopathogens was lower than those by low molecular weight CS and CS oligosaccharides. This strongly suggests that the depolymerized products of CS are effective for growth inhibition. Only a medium

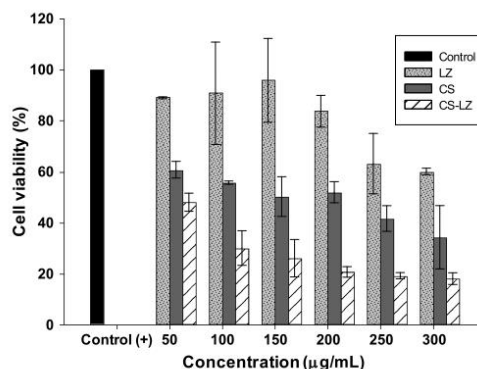


Fig. 3 Effect of lysozyme (LZ), chitosan nanoparticles (CS) and chitosan-lysozyme nanoparticles (CS-LZ) on the spores viability of *Aspergillus parasiticus*

inhibition was reported against *Valsa mali* and *F. oxysporum* *F. sp. lycopersici* (Hirano and Nagao 1989).

When *Aspergillus parasiticus* was grown in media with added CS NPs, a spore viability of 38–60% was observed, which was proportionally reduced when the concentration of CS NPs in the culture media increased (Fig. 3). This demonstrates the inherent antimicrobial potential of chitosan, in solution and/or chitosan particles, which has been previously tested (Cota-Arriola et al. 2013a; Luque-Alcaraz et al. 2016; Yien et al. 2012). For example, *A. niger* was found to be resistant to chitosan NPs except for those prepared from concentrations of 2 and 3 mg/mL of high molecular weight chitosan (310 kDa Mw, 85% DD); the inhibitory activity was measured by broth microdilution procedure and could only be detected for solutions from 310 and 70 kDa chitosans (Yien et al. 2012). In agreement with the authors, fungi that have chitosan in the cell are more resistant to exogenous chitosan, which could therefore explain the high resistance of *Aspergillus* species such as *A. fumigatus* and *A. niger* as it contains about 10% of chitin in its cell wall (Yien et al. 2012; Klis et al. 2007; Bernard and Latgé 2001).

The effect of chitosan nanoparticles on the fungi viability may be related to its toxicity. Chitosan NPs (200 nm) prepared by ionic cross-linking with sodium tripolyphosphate caused malformations (bent spine, pericardial edema, and an opaque yolk) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Also, a decreased hatching rate and increased mortality (concentration dependent) was observed, besides a high expression of reactive oxygen species and an overexpression of heat shock protein 70 (Hu et al. 2011).

In this work, the antifungal effect was higher in *A. parasiticus* grown in media with added CS-LZ nanoparticles, and a significant ($P < 0.05$) reduction on the spore

viability was observed with respect to the control. The maximal value of viable spores was 48% at the lowest NPs concentration tested (50 µg/mL), which was reduced to a value of 18% at a higher concentration (300 µg/mL) (Fig. 3). At all concentrations tested, the antifungal activity of CS–LZ particles was significantly higher ($P < 0.05$) compared with treatments alone, the chitosan NPs and lysozyme. This suggests that lysozyme immobilization in chitosan is feasible to reduce the spore viability of toxigenic fungi such as *A. parasiticus*, since a more effective antifungal activity can be resulted, which could be related to a possible synergistic effect when chitosan and lysozyme are combined. Due to the positive Z potential, interactions between positive charges on the CS–LZ nanoparticles surface with negative charges of the cell wall of fungus can occur. Besides the hydrolytic capacity of lysozyme (Salazar and Asenjo 2007), other explanation may be related to the chito oligomers production by lysozyme (Zimoch-Korzycka et al. 2015) and the consequent formation of oligomers–lysozyme complexes, with enhanced antimicrobial activity.

Based on inhibition zone diameters using the disc diffusion method, integration of lysozyme into CS nanoparticles (488 and 613 nm, Z potential of +21 and +14 mV, prepared by ionotropic gelation with TPP at pH of 4 and 5, respectively) enhanced the antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. For *E. coli*, breakage of the basement membrane, leakage of some cytoplasm, degradation of cells from a round column to an irregular shape and complete rupture were observed (Wu et al. 2017). Using the same ionotropic gelation method, Piras et al. (2014) prepared chitosan (Mw 50–190 kDa, DD 75–85%) NPs loaded with lysozyme, which showed a full in vitro cytocompatibility toward murine fibroblasts and effectively preserved the antibacterial activity of the enzyme against *S. epidermidis* (in about 2 log reduction of the number of viable bacteria) compared to chitosan NPs.

Although the activity of CS–LZ nanoparticles against bacteria species has been previously tested, no studies regarding its effect on the viability of toxigenic filamentous fungi were reported before, thus hampering the comparison of the obtained results with others. In a previous work, chitosan–pepper tree essential oil bionanocomposites (754 ± 7.5 nm and Z potential of + 9.1 ± 1.74 mV) prepared by the nanoprecipitation technique reduced the viability of fungal spores of *A. parasiticus*, having about 50% of viable spores in the treatment with higher concentrations (200 µg/mL) of chitosan/pepper tree bionanocomposites with respect to the control (Luque-Alcaraz et al. 2016). As occurred for CS–LZ nanoparticles, the antifungal effect of CS–pepper tree oil particles decreased when the bionanocomposite concentration was reduced, which was attributed to electrostatic interactions of van der

Waals type and hydrogen bonds between the components present in the fungus cell membrane and the bionanocomposites.

From the experimental data of the spore viability of *Aspergillus parasiticus* assay, CI_{50} values of 155.2 ± 19.6 and 41.7 ± 6.4 µg/mL were estimated for CS nanoparticles and CS–LZ nanoparticles, respectively, which confirmed the strong inhibitory effect of the CS–LZ nanoparticles on the in vitro viability of fungi. The CI_{50} estimated doses were used for subsequent biological assays to assess the antimicrobial activity.

Effect on the spore germination of *Aspergillus parasiticus*

The CS and CS–LZ nanoparticles strongly affected the spore germination of fungi with respect to the control and an inhibition of 100% was observed at 24 h (Table 2). This can be attributed to the electrostatic interactions between chitosan amino groups with fungi cell wall components, besides the high surface charge (Z potential) and the small particle size. The inhibitory effect of CS–LZ nanoparticles against *A. parasiticus* was higher compared to previous results for CS–TPP particles (20–80 µm) prepared by ionotropic gelation, where an inhibition of spore germination of 77% was observed for *A. parasiticus*; a lower inhibitory effect was observed when fungus was exposed to smaller size particles, which was attributed to the agglomeration of particles that provides a surface where the spore may adhere to germinate (Cota-Arriola et al. 2013a). Also, the incorporation of ferulic acid into micro- and nanoparticles of chitosan potentiated the inhibitory effect on the spore germination, which was attributed to the increase of the Z potential of the particles, besides the calcium chelating potential and electrostatic interactions caused by chitosan (Cota-Arriola et al. 2013a).

It has been reported that Cu–chitosan nanoparticles are more effective at 0.1% concentration and show 89.5, 63.0, and 60.1% growth inhibition of *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria alternata*, and *Rhizoctonia solani*, respectively, in in vitro model. The maximum inhibition rates of 87.4 and 87.1% of *A. alternata* germination were observed for Cu–CS and CS NPs, respectively, which could be due to the high superficial charge density that provides a major binding affinity for negatively charged compounds in the fungal membrane (Saharan et al. 2015). At 0.12% concentration, Cu–CS NPs (374.3 ± 8.2 nm, Z potential of + 22.6 mV) caused 70.5 and 73.5% inhibition of mycelia growth and 61.5 and 83.0% inhibition of spore germination in *A. solani* and *F. oxysporum*, respectively (Saharan et al. 2015). According to the authors, the Z potential of Cu–CS NPs is crucial to assess the antifungal activity and nanoparticle stability.

Table 2 Spore germination, spore diameter, and reducing sugar quantification by *Aspergillus parasiticus* inoculated in culture media with added chitosan nanoparticles and chitosan-lysozyme nanoparticles, at 24 h, at 27 °C

Treatment	Spore germination (%)	Spore diameter (μm)	Reducing sugars production (μm/mL)
Control	87.6 ± 2.5	4.69 ± 0.074 ^a	501.11 ± 7.25 ^c
Chitosan-lysozyme nanoparticles	0	4.76 ± 0.070 ^a	173.06 ± 13.71 ^b
Chitosan nanoparticles	0	4.90 ± 0.074 ^a	124.54 ± 6.25 ^a

Data, followed by their standard errors, are means of at least three experiments. Treatment means were separated using the Tukey test ($P > 0.05$). Different letters in superscript indicate significant differences ($P < 0.05$)

Morphometric analysis of spores

Changes in morphometric parameters indicated the morphological changes undergone by the fungus in the presence of adverse factors in their adaptation and development (Cota-Arriola et al. 2013a). For fungi, plasma membrane has been reported as the main chitosan target (Aranda-Martinez et al. 2016) and morphological anomalies such as swelling, echinulate spores, delay in breaking dormancy, polarization, and germ tube emergence have been observed in spores of *A. niger* grown in media with added chitosan, which was explained by interferences caused by chitosan on the nutrients or minerals (calcium) (Cota-Arriola et al. 2013a; Plascencia-Jatomea et al. 2003).

The exposition of *Aspergillus parasiticus* to CS-LZ nanoparticles resulted in a slight increment ($P > 0.05$) of the average spore diameter with respect to control (Table 2). Based on the above, the swelling caused by the CS-LZ nanoparticles may be related to electrostatic interactions that eventually could lead to an osmotic or oxidative stress. Changes in chemical structure and physiological characteristics of nanoparticles lead to changes in biological properties and the ROS generation is the most commonly reported NPs-associated toxicities, where cellular responses (NP-cell interaction, mitochondrial respiration, and immune cell activation) are responsible of damages mediated by ROS (Manke et al. 2013).

The effect of various nanomaterials is different. Some nanoparticles induce higher cytotoxicity and oxidative impairment, whereas others cause higher DNA damage. Surface properties and chemical composition of particles may have a key role in the ROS generation. However, the genotoxicity of nanoparticles at lower exposure doses may be primarily due to particle shape (Yang et al. 2009).

The swelling of *A. parasiticus* spores can be also attributed to the low particle size (<14 nm), which allows them to penetrate more easily through the fungal cell wall and membrane, being able to interact with the cellular material within the spore, thereby causing and unbalance or stopping metabolic functions. This is supported by the strong inhibitory effect observed in the germination of

spores of fungi (Table 2), where no germinated spores were observed at 24 h.

β-1,3-Glucanase enzymatic assay

Cellulases are high molecular colloidal proteinaceous biocatalyst and the extracellular cellulolytic enzyme system consists of three major enzyme components: endoglucanase, exoglucanases or cellobiohydrolases, and β-glucosidase or cellobiases. β-Glucanases are required for hyphal morphogenesis and are believed to play cell wall remodeling roles during growth and morphogenesis in filamentous fungi. β-1,3-Glucanase is produced by many bacteria, plants, and fungi such as *Trichoderma* and *Aspergillus*, and are related to the hyphal transformation in *Candida albicans* (Xu et al. 2013).

In this work, a significantly ($P < 0.05$) low production of reducing sugars was detected in the culture media with added CS and CS-LZ NPs with respect to control, obtaining an inhibition of 75.2% for *A. parasiticus* grown in media with added CS-LZ NPs (Table 2). These results confirm the strong inhibitory effect on the first stage of fungal growth. Differences on the reducing sugar production could be related to affectations on the β-1,3 glucan production and therefore the β-1,3-glucanase activity, the main component of the fungi cell wall and enzyme involved in the synthesis of β-1,3-glucan, respectively.

At the nanoscale level, supported by limited experimental evidence, it was reported that materials have effects such as oxidative stress and protein denaturation/degradation, whose possible pathophysiology outcomes are phase II enzyme induction via transcriptional activation and loss of enzyme activity, respectively, among others (Nel et al. 2006). The exposition of *E. coli* to silver NPs resulted in the leakage of reducing sugars and proteins and induced the respiratory chain dehydrogenases into inactive state. Many pits and gaps were observed and the membrane was fragmentary, suggesting that Ag NPs affect the permeability of the bacterial membranes (Li et al. 2010).

Also, a significantly improved antibacterial activity against *S. aureus* has been reported for water-soluble

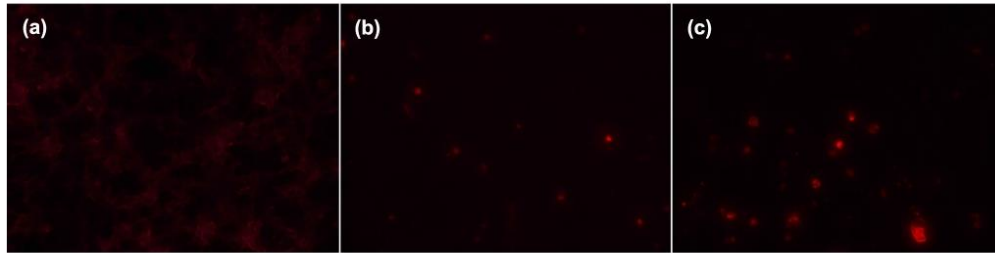


Fig. 4 Mycelium and spores of *Aspergillus parasiticus* grown in culture media with added chitosan and chitosan-lysozyme nanoparticles stained with propidium iodide. **a** Branched mycelium of fungi

in the control media; **b** Non-germinated spores treated with chitosan nanoparticles; **c** Non-germinated spores treated with chitosan-lysozyme nanoparticles, showing membrane integrity damages

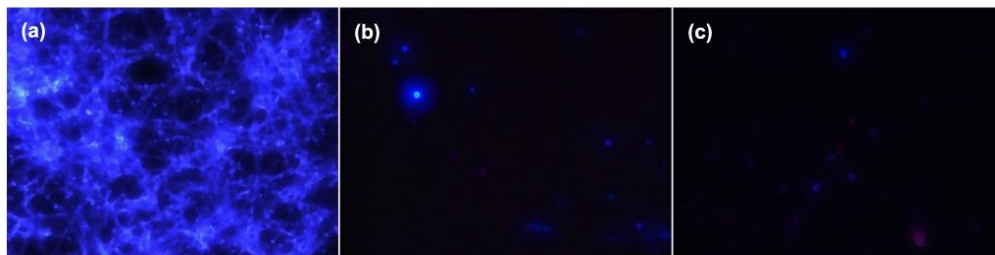


Fig. 5 Mycelium and spores of *Aspergillus parasiticus* grown in culture media with added chitosan and chitosan-lysozyme nanoparticles stained with calcofluor-white. **a** Branched mycelium of fungi in

control media; **b** Non-germinated spores treated with chitosan nanoparticles, and **c** Non-germinated spores treated with chitosan-lysozyme nanoparticles, showing low glucan/chitin content (**b** and **c**)

quaternized carboxymethyl chitosan-Ag NPs (Huang et al. 2016) and Ag NPs coated with chitosan (with different sizes and shapes) presented antibacterial activity against clinical stocks of *Streptococcus mutans*, which was associated with smaller NPs (Martínez-Robles et al. 2016). For chitosan, the regulatory functions in a simple fungal-plant interaction can involve the activation of specific genes in plants and the complete inhibition of all RNA synthesis in some fungal organisms and thus suppress gene activity (Hadwiger et al. 1986). If chitosan can affect the RNA synthesis in fungi, it is feasible to predict that enzymatic function may be also compromised.

However, to date no information is available about the effect of bio-based polymeric nanoparticles on the enzyme production in bacteria or filamentous fungi species. So, this is the first report that describes the effect of chitosan and chitosan-lysozyme NPs on the viability, germination, and reducing sugars production (associated with the production of enzymes involved with the cell wall synthesis and cell differentiation) in toxigenic fungi such as *A. parasiticus*.

Taking into account that the interaction between enzymes and NPs is governed by the properties of NPs, such as structure, size, charge, surface chemistry and shape (Wu et al. 2009), it is possible that CS-LZ nanoparticles may damage the structure of fungi cell wall and depress the

activity of membranous enzymes like glucanases, reducing the glucan synthesis and therefore causing the interruption of the spore germination. Other cellular components or important enzymes for metabolism of the fungus can also be affected.

Effect on the membrane integrity and cell wall of *Aspergillus parasiticus*

Silver metallic NPs could enhance the membrane leakage of reducing sugars from cytoplasm in *E. coli*. Also, empty membrane vesicles, disorganized and dispersed membrane components, were observed (Li et al. 2010). In contrast, from live/dead assay, the ratio obtained from the microbial suspensions of nitrifying bacteria and *E. coli*, PHL628-gfp treated with Ag NPs (1 mg/L Ag) showed no difference compared to controls, suggesting that there is no evidence of cell membrane leakage caused by Ag NPs, Ag⁺ ions or AgCl colloids (Choi et al. 2008).

In this study, effects caused by CS and CS-LZ nanoparticles on the membrane of *A. parasiticus* were observed using propidium iodide (PI) dye, which enter into the cell when the membrane integrity is compromised. A high amount of non-stained germinated spores and hyphae were observed in the control media (Fig. 4a); however, the fungi cells treated with

both CS and CS–LZ nanoparticles were stained with PI, which shows the damage to the cell membrane caused by NPs (Fig. 4b, c). Only non-germinated spores were observed in media with added NPs, which is consistent with the results found in the spore germination assay.

The effect of CS and CS–LZ nanoparticles on the fungi cell wall polymeric components was determined by staining with calcofluor-white (CW) dye, which binds chitin and glucan allowing display the cell wall. When spores and hyphae grown in control media were observed, a high amount of stained mycelium was noted (Fig. 5a) that could be related with the normal growth of *A. parasiticus*. In contrast, only a few stained spores grown in media with CS and CS–LZ NPs were observed (Fig. 5b, c), suggesting a low content or deposition of glucan and chitin in the fungi cell wall. This is consistent with the low amount of reducing sugars (Table 2) detected in media with added NPs, suggesting a low activity or a low production of glucanase enzymes.

The *efg1* and *cek1* pathways control the filamentation process in *C. albicans*. This process is induced by β -1,3 glucanase, which may be an adaptive and protective response to enzymes that damage the cell wall glucan (Xu et al. 2013). Based on the above, it is possible that the CS and the CS–LZ nanoparticles affected the integrity of the cellular membrane of *A. parasiticus* by disturbing the metabolic pathways related to the glucans synthesis.

With regard to the action mechanisms of nanoparticles, the model for Ag metallic NPs may be described in two stages: (1) Ag NPs make a break through the permeability of outer membrane firstly, resulting in the leakage of cellular materials. (2) Ag NPs enters the inner membrane and inactivate respiratory chain dehydrogenases, thus inhibiting respiration and growth of cells. Simultaneously, Ag NPs may affect proteins and phosphate lipids and induce collapse of membrane, resulting in cell decomposition and death (Li et al. 2010). Considering the obtained results, it is possible to deduce that the CS and CS–LZ nanoparticles affect the viability and growth of *A. parasiticus* in two ways: (a) by causing membrane destabilization through intra- and intermolecular chemical interactions between functional groups of CS and lysozyme with components of the cell wall, and (b) by reducing the viability and preventing the germination of spores, possibly due to damages in the synthesis of the cell wall-associated components or enzymes (Xu et al. 2013; Hadwiger et al. 1986), as well as due to the small size of NPs (Wu et al. 2009).

Conclusions

This study demonstrated that with the use of nanoprecipitation technique, it is feasible to obtain chitosan–lysozyme NPs, with a small size and a strong antifungal activity

against *A. parasiticus*. In in vitro assays, the CS–LZ NPs proved to be more effective than CS NPs to reduce the viability and to inhibit the germination of spores. Structural affectations could be associated with the β -1,3-glucanase production, since a diminution in the reducing sugar production was detected. The CS–LZ nanoparticle systems promise to be a viable alternative for agricultural purposes; however, the potential benefits and applications must be balanced with environment and health implications, due to the potential adverse effects on microbial activity.

Acknowledgements The study was funded by the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT) through the project No. 219786 (CB-2013-01) and for the scholarship to Cynthia Nazareth Hernández-Téllez for postgraduate studies. The authors acknowledge the University of Sonora for the assistantship grant to Francisco Julián Rodríguez-Córdova for undergraduate studies.

Author contribution Maribel Plascencia-Jatomea conceived and designed the experiments. Cynthia Nazareth Hernández-Téllez, Francisco Julián Rodríguez-Córdova and Aaron Martínez-Higuera performed the experiments. Ema Carina Rosas Burgos, Mario Onofre Cortez-Rocha, Armando Burgos-Hernández, Wilfrido Torres-Areola and Jaime Lizardi-Mendoza analyzed the data and contributed with reagents, materials and analysis tools. Cynthia Nazareth Hernández-Téllez and Maribel Plascencia-Jatomea wrote the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Aranda-Martinez A, Lopez-Moya F, Lopez-Llorca LV (2016) Cell wall composition plays a key role on sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *J Basic Microbiol* 56:1059–1070
- Benhabiles M, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen M, Mameri N (2012) Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocol* 29:48–56
- Bernard M, Latgé J-P (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 39:9–17
- Bilati U, Allémann E, Doelker E (2005) Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 24:67–75
- Buitimea-Cantúa GV, Rosas-Burgos EC, Cinco-Moroyoqui FJ, Burgos-Hernández A, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO, Gálvez-Ruiz JC (2013) In vitro effect of antifungal fractions from the plants *baccharis glutinosa* and *jacquinia macrocarpa* on chitin and β -1, 3-glucan hydrolysis of maize phytopathogenic fungi and on the fungal β -1, 3-glucanase and chitinase activities. *J Food Saf* 33:526–535
- Camacho Elizondo M, Vega Baudrit J, Campos Gallo A (2011) Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 77:292–306
- Charernsrilailaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T (2012) Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. *Int J Pharm* 427:379–384
- Chavan PS, Tupe SG (2014) Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control* 46:115–120

- Choi O, Deng KK, Kim N-J, Ross L, Surampalli RY, Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res* 42:3066–3074
- Cota-Arriola O, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM, Lizardi-Mendoza J, Burgos-Hernández A, Robles-Sánchez RM, Plascencia-Jatomea M (2013a) Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *J Polym Environ* 21:971–980
- Cota-Arriola O, Onofre Cortez-Rocha M, Burgos-Hernández A, Marina Ezquerro-Brauer J, Plascencia-Jatomea M (2013b) Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *J Sci Food Agric* 93:1525–1536
- Cota-Arriola O et al (2016) Preparation of chitosan matrices with ferulic acid: physicochemical characterization and relationship on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *CyTA-J Food* 15(1):65–74. doi:10.1080/19476337.2016.1213317
- Datta S, Christena LR, Rajaram YRS (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials 3. *Biotech* 3:1–9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7
- Deng Q-Y, Zhou C-R, Luo B-H (2006) Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharm Biol* 44:336–342
- Durango A, Soares N, Benevides S, Teixeira J, Carvalho M, Wobeto C, Andrade N (2006) Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan. *Packag Technology Sci* 19:55–59
- El Guilli M, Hamza A, Clément C, Ibriz M, Ait Barka E (2016) Effectiveness of postharvest treatment with chitosan to control citrus green mold. *Agriculture* 6:12
- Hadwiger L, Kendra D, Fristensky B, Wagoner W (1986) Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In: Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW (eds) *Chitin in nature and technology*. Springer, Boston, MA, pp 209–214
- Hirano S, Nagao N (1989) Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric Biol Chem* 53:3065–3066
- Hirano S, Yamaguchi R, Fukui N, Iwata M (1990) A chitosan oxalate gel: its conversion to an *N*-acetylchitosan gel via a chitosan gel. *Carbohydr Res* 201:145–149
- Hu Y-L, Qi W, Han F, Shao J-Z, Gao J-Q (2011) Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. *Int J Nanomed* 6:3351–3359
- Huang W, Xu H, Xue Y, Huang R, Deng H, Pan S (2012) Layer-by-layer immobilization of lysozyme–chitosan–organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Res Int* 48:784–791
- Huang S, Wang J, Zhang Y, Yu Z, Qi C (2016) Quaternized carboxymethyl chitosan-based silver nanoparticles hybrid: microwave-assisted synthesis. *Charact Antibact Act Nanomat* 6:118
- Klis F, Ram A, De Groot P (2007) A molecular and genomic view of the fungal cell wall. In: Howard RJ, Gow NAR (eds) *Biology of the fungal cell*. Springer, Heidelberg, pp 97–120
- Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Zeng H-Y, You-Sheng O-Y, Chen Y-B (2010) Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1115–1122
- Lian Z-X, Ma Z-S, Wei J, Liu H (2012) Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings. *Process Biochem* 47:201–208
- Lin C-W, Chen L-J, Lee P-L, Lee C-I, Lin J-C, Chiu J-J (2007) The inhibition of TNF- α -induced E-selectin expression in endothelial cells via the JNK/NF- κ B pathways by highly *N*-acetylated chitoooligosaccharides. *Biomaterials* 28:1355–1366
- Luque-Alcaraz AG et al (2012) Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles. *J Nanomater* 2012:100
- Luque-Alcaraz AG et al (2016) Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *J Nanomater* 2016:38
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y (2013) Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Res Int* 2013:15. doi:10.1155/2013/942916
- Martínez-Robles ÁM et al (2016) Antimicrobial properties of biofunctionalized silver nanoparticles on clinical isolates of *streptococcus mutans* and its serotypes. *Nanomaterials* 6:136
- Medina-López CF, Plascencia-Jatomea M, Cinco-Moroyoqui FJ, Yépiz-Gómez MS, Cortez-Rocha MO, Rosas-Burgos EC (2016) Potentiation of antifungal effect of a mixture of two antifungal fractions obtained from *Baccharis glutinosa* and *Jacquinia macrocarpa* plants. *J Environ Sci Health* 51:760–768
- Meletiadi J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Donnelly JP, Verweij PE, Network E (2001) Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 39:3402–3408
- Nel A, Xia T, Mädlar L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *science* 311:622–627
- Ojijo V, Ray SS (2013) Processing strategies in bionanocomposites. *Prog Polym Sci* 38:1543–1589
- Park P-J, Je J-Y, Byun H-G, Moon S-H, Kim S-K (2004) Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *J Microbiol Biotechnol* 14:317–323
- Patel S, Jammalamadaka U, Sun L, Tappa K, Mills DK (2015) Sustained release of antibacterial agents from doped halloysite nanotubes. *Bioengineering* 3:1
- Piras AM, Maisetta G, Sandreschi S, Esin S, Gazzarri M, Batoni G, Chiellini F (2014) Preparation, physical–chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. *Int J Biol Macromol* 67:124–131
- Plascencia-Jatomea M, Viniestra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM, Shirai K (2003) Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol Biosci* 3:582–586
- Plascencia-Jatomea S, Gómez Y, Vales-Haro J (2014) *Aspergillus* spp. (Black Mold). In: Bautista-Baños S (ed) *Postharvest decay: control strategies*. Elsevier Inc., Academic Press, New York, pp 267–286
- Qun G, Ajun W (2006) Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution. *Carbohydr Polym* 64:29–36
- Rahman MH, Hjeljord LG, Aam BB, Sørlie M, Tronsmo A (2015) Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *Eur J Plant Pathol* 141:147–158
- Ren D, Yi H, Wang W, Ma X (2005) The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of *N*-acetylation. *Carbohydr Res* 340:2403–2410
- Rhim J-W, Park H-M, Ha C-S (2013) Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog Polym Sci* 38:1629–1652
- Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1:1458–1461
- Saharan V et al (2015) Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *Int J Biol Macromol* 75:346–353
- Salazar O, Asenjo JA (2007) Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett* 29:985–994
- Wang S, Ng TB, Chen T, Lin D, Wu J, Rao P, Ye X (2005) First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochem Biophys Res Commun* 327:820–827

- Wang Y, Li P, Truong-Dinh Tran T, Zhang J, Kong L (2016) Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials* 6:26
- Wu Z, Zhang B, Yan B (2009) Regulation of enzyme activity through interactions with nanoparticles. *Int J Mol Sci* 10:4198–4209
- Wu T, Wu C, Fu S, Wang L, Yuan C, Chen S, Hu Y (2017) Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. *Carbohydr Polym* 155:192–200
- Xu Y, Du Y (2003) Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 250:215–226
- Xu H, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A (2013) Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PloS One* 8:e63736
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z (2009) Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 29:69–78
- Yien L, Zin NM, Sarwar A, Katas H (2012) Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int J Biomater* 2012:9. doi:10.1155/2012/632698
- Yuceer M, Caner C (2014) Antimicrobial lysozyme–chitosan coatings affect functional properties and shelf life of chicken eggs during storage. *J Sci Food Agric* 94:153–162
- Zhang X, Zhao J, Wen Y, Zhu C, Yang J, Yao F (2013) Carboxymethyl chitosan-poly (amidoamine) dendrimer core-shell nanoparticles for intracellular lysozyme delivery. *Carbohydr Polym* 98:1326–1334
- Zhang L, Liu T, Xiao Y, Yu D, Zhang N (2015) Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles to deliver Gd-DTPA for MR cancer imaging. *Nanomaterials* 5:1379–1396
- Zimoch-Korzycka A, Gardrat C, Castellan A, Coma V, Jarmoluk A (2015) The use of lysozyme to prepare biologically active chitoooligomers. *Polimeros* 25:35–41

CAPÍTULO 3. Síntesis y caracterización de partículas de quitosano, carragenina y lisozima por complejación iónica, actividad biológica contra *Aspergillus parasiticus*.

**CHITOSAN/CARRAGEENAN/LYSOZYME PARTICLES: SYNTHESIS,
CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Aspergillus
parasiticus***

Hernández-Téllez, C., Cortez-Rocha, M., Burgos-Hernández, A., Rosas-Burgos, E., Lizardi-Mendoza, J., Torres-Arreola, W., Plascencia-Jatomea, M. (2018). CHITOSAN/CARRAGEENAN/LYSOZYME PARTICLES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Aspergillus parasiticus*. REVISTA MEXICANA DE INGENIERIA QUIMICA, 17(3), 897-912. doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Hernandez



PARTÍCULAS DE QUITOSANO/CARRAGENINA/LISOZIMA: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Aspergillus parasiticus*

CHITOSAN/CARRAGEENAN/LYSOZYME PARTICLES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Aspergillus parasiticus*

C.N. Hernández-Téllez¹, M.O. Cortez-Rocha¹, A. Burgos-Hernández¹, E.C. Rosas-Burgos¹, J. Lizardi-Mendoza², W. Torres-Arreola¹, M.G. Burboa-Zazueta³, M. Plascencia-Jatomea^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

²Laboratorio de Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México.

³Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

Recibido 31 de enero de 2018; Aceptado 5 de marzo de 2018

Resumen

En este estudio se sintetizaron partículas de quitosano-carragenina (Cs-Crg) y quitosano-carragenina-lisozima (CS-Crg-LZ) por complejación iónica. Las partículas se analizaron por microscopía de fuerza atómica, dispersión de luz dinámica y FT-IR, y se determinó el porcentaje de asociación de la lisozima. La actividad biológica de las partículas se evaluó mediante ensayos de viabilidad de esporas de *Aspergillus parasiticus* y citotoxicidad en células ARPE-19. El efecto sobre estructuras subcelulares se analizó por microscopía de fluorescencia. La adición de la lisozima redujo el tamaño de las partículas. El tamaño y el potencial Z de las partículas sintetizadas fue de 725 ± 5.5 y 250 ± 8.1 nm y 28.7 ± 1.0 y 21.6 ± 0.8 mV para CS-Crg y CS-Crg-LZ, respectivamente. Ambas partículas exhibieron un mayor ($p < 0.05$) efecto inhibitorio sobre la viabilidad de *A. parasiticus* con respecto al control, que se incrementó de manera proporcional a la concentración de partículas. Ninguna de las partículas mostró efecto mutagénico y tampoco resultaron ser citotóxicas en células ARPE-19; asimismo, no se evidenciaron cambios morfológicos con respecto al control, observando estructuras normales en el citoesqueleto de actina y en el ADN. Estos resultados demuestran que las partículas de base quitosano-carragenina constituyen una opción factible y segura para el control de hongos patógenos de interés agrícola-alimentario.

Palabras clave: carragenina, biocompositos, estructuras subcelulares, citotoxicidad, liberación de proteína.

Abstract

In this study, particles of chitosan-carrageenan (Cs-Crg) and chitosan-carrageenan-lysozyme (CS-Crg-LZ) were synthesized by ionic complexation. The particles were analyzed by atomic force microscopy, dynamic light scattering and FT-IR, and the percentage of association of lysozyme was determined. The biological activity of the particles was evaluated by viability assays of *Aspergillus parasiticus* spores and cytotoxicity in ARPE-19 cells. The effect on subcellular structures was analyzed by fluorescence microscopy. The addition of lysozyme reduced the size of the particles. The size and Z potential of the synthesized particles were 725 ± 5.5 and 250 ± 8.1 nm and 28.7 ± 1.0 and 21.6 ± 0.8 mV for CS-Crg and CS-Crg-LZ, respectively. CS-Crg-LZ and CS-Crg particles exhibited a higher ($p < 0.05$) inhibitory effect on the viability of *A. parasiticus* with respect to control, which increased proportionally to the particles concentration. None of the particles showed a mutagenic effect and they did not present cytotoxicity in ARPE-19 cells; likewise, no changes were observed in cell morphology with respect to control, observing normal structures in the actin cytoskeleton and in the DNA structure. These results show that chitosan-based particles are a feasible and safe option for the control of pathogenic fungi of agricultural-food interest.

Keywords: carrageenan, biocomposites, subcellular structures, cytotoxicity, protein release.

* Autora para la correspondencia. E-mail: maribel_plascencia@unison.mx
doi: 10.24275/uamfzt/dcbj/revmexingquim/2018v17n3/Hernandez
issn-e: 2395-8472

1 Introducción

El desarrollo de partículas elaboradas a partir de polímeros biológicos ha adquirido gran interés en investigación debido a su potencial aplicación en la industria agroalimentaria, además del rol que estos materiales de base biológica pueden desempeñar en la seguridad e inocuidad alimentaria.

El quitosano es el principal derivado de la quitina, un polisacárido natural con un amplio uso y distribución en la naturaleza, ocupando el segundo lugar en la biósfera después de la celulosa, con una tasa de regeneración de 10^9 - 10^{11} toneladas anuales. A nivel comercial, el quitosano se extrae generalmente mediante la desacetilación termoalcalina de la quitina proveniente del exoesqueleto de crustáceos, aunque también se le encuentra en la pluma o concha interna de calamares, cutícula de insectos y paredes celulares de microorganismos como hongos y levaduras (Elgadir y col., 2015). Es uno de los biopolímeros más utilizados para la síntesis de nanopartículas (NP's) debido a sus características estructurales únicas y a su naturaleza policatiónica, además de sus propiedades biológicas y funcionales como biodegradabilidad, mucoadhesividad, biocompatibilidad, filmogenicidad, y actividad antimicrobiana, entre otras (Pérez-Alonso y col., 2015; Rosales-Martínez y col., 2017). Asimismo, tiene capacidad de ligar no sólo diversos cationes metálicos (Cu, Ag, Zn, Al, etc.), sino también compuestos orgánicos susceptibles a la degradación o hidrólisis tales como extractos de aceites esenciales, péptidos o enzimas, proporcionando protección contra diversos factores extrínsecos (Bautista-Baños y col., 2017; Luque-Alcaraz y col., 2016); (Sotelo-Boyás y col., 2015). Por otra parte, el quitosano también promueve la unión con agentes entrecruzantes como el tripolifosfato de sodio (TPP), glutaraldehído, carragenina, etc, formando una red polimérica eficaz para el atrapamiento de las moléculas del compuesto en las nanopartículas (Elgadir y col., 2015; Prabakaran, 2015).

La bioactividad del quitosano se atribuye principalmente a los grupos amino ($-NH_3^+$) protonados de la glucosamina, que se forman cuando el biopolímero se encuentra en soluciones diluidas, a pH ácido <6.4. Bajo estas condiciones, la mayoría de los polisacáridos son neutros o bien

tienen carga negativa; no obstante, el quitosano como polielectrolito catiónico es capaz de facilitar la formación de interacciones electrostáticas con otros grupos aniónicos. Esta propiedad forma parte de los mecanismos de acción del quitosano, como es la interacción electrostática al estar en contacto con superficies cargadas negativamente, lo cual puede ocasionar modificaciones moleculares (Elgadir y col., 2015).

La lisozima es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en fluidos biológicos de animales mamíferos, plantas y microorganismos. Es una enzima de bajo peso molecular (14.3 kDa), alto punto isoeléctrico ($pI \approx 11$) y posee gran potencial antimicrobiano y antiviral (Cai y col., 2008; Huang y col., 2012; Ibrahim y col., 2001), siendo efectiva contra microorganismos patógenos que deterioran alimentos. Su principal mecanismo de acción es actuando directamente en la pared celular bacteriana afectando su permeabilidad (Huang y col., 2012). Otro biopolímero de importancia que se ha utilizado ampliamente en diferentes productos alimenticios, es la carragenina, un polisacárido lineal sulfatado conformado por unidades de D-galactosa y 3,6-anhidro-D-galactosa que se obtiene a nivel comercial a partir de la extracción de ciertas algas rojas de la clase *Rhodophyceae* (Li y col., 2014). Este polímero es clasificado dependiendo del grado de sustitución de grupos sulfatos, las principales estructuras de importancia comercial son 3 tipos: kappa (κ), iota (i) y lambda (λ), conteniendo en su estructura uno, dos y tres grupos sulfatos, correspondiente al cálculo en porcentaje aproximado de 20, 33 y 41%, respectivamente (Li y col., 2014). La carragenina puede interactuar con polielectrolitos como el quitosano cuando este se encuentra protonado en medios ácidos, pudiendo formar complejos, siendo cada vez más utilizado para encapsular distintos biocomponentes (Dima y col., 2014). Esta se ha utilizado ampliamente en diferentes productos de alimentos, ya que está aprobado por la industria alimentaria (Grenha y col., 2010).

El objetivo de este trabajo fue sintetizar partículas a base de quitosano con lisozima acoplada mediante carragenina por el método de complejación iónica, evaluar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas en parámetros toxicidad y cambios morfológicos en células ARPE-19, así como evaluar su actividad antifúngica sobre esporas de *Aspergillus parasiticus*.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Se utilizaron muestras comerciales de quitosano (CS) de peso molecular medio (153 kDa, 78 % grado de desacetilación, Aldrich cat. 448877), lisozima (LZ) de clara de huevo de gallina (polvo liofilizado, proteína ≥ 90 %, $\geq 40,000$ unidades/mg proteína, Sigma cat. L6876) y carragenina (Crg) de algas marinas (no gelificante, mezcla de lambda y kappa-carrageninas, Sigma cat. C1867). Todos los solventes y reactivos utilizados fueron grado reactivo.

2.2 Cultivo del microorganismo

Se preparó un cultivo monospórico de *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA, Bioxon, USA) y se mantuvo a 4°C hasta su utilización (Xu y col., 2013). Para su propagación, las esporas fueron resuspendidas en solución Tween 80 al 0.05% (v/v) y se determinó la concentración de esporas por mL de suspensión utilizando conteo en cámara de Neubauer (Chávez-Magdalen y col., 2018). La determinación de la actividad antifúngica se llevó a cabo utilizando medio de cultivo líquido Czapek.

2.3 Cultivo de células

Se utilizaron células ARPE-19 (línea celular epitelial de pigmento retiniano humano). Estas fueron cultivadas en cajas de cultivo de 25 cm³ en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), adicionado con 5% de suero fetal bovino, 100 μ /mL de penicilina, a 37°C en una atmósfera de CO₂ de 5% y 38% de humedad (Hu y col., 2013).

2.4 Elaboración de las partículas

Las partículas fueron elaboradas mediante el método de complejación iónica, de acuerdo a la técnica reportada por Grenha y col. (2010). Brevemente, se preparó una solución de CS con concentración de 0.5 mg/mL en ácido acético al 1% (v/v), con Tween 80 al 0.05% (p/v); asimismo se preparó una solución de Crg a la misma concentración (0.5 mg/mL), disuelta en agua MiliQ a 40°C. Las partículas biopoliméricas de CS-Crg se formaron mediante la adición gota a gota de 1 mL de la solución de Crg a un vaso conteniendo 4 mL de la solución de CS, utilizando

una bomba peristáltica a un flujo constante de 0.87 mL/min, con agitación magnética continua de 500 rpm. Estas partículas fueron utilizadas como control. Para la obtención de las partículas de CS-Crg cargadas con LZ (CS-Crg-LZ), se preparó una solución de LZ con concentración de 0.5 mg/mL en agua MiliQ. Se tomó 1 mL de ella y se adicionó lentamente a un vaso previamente adicionado con 4 mL de la solución de CS (con concentración de 0.5 mg/mL), manteniendo la agitación magnética de 500 rpm por 20 min; posteriormente, se añadió 1 mL de la solución de Crg (con concentración de 0.5 mg/mL) utilizando la bomba peristáltica al mismo flujo, manteniendo la solución 15 min más en agitación magnética. Una vez obtenidas, ambos tipos de partículas (CS-Crg y CS-Crg-LZ) se purificaron por diálisis con agua deionizada, utilizando membranas estándar de celulosa de 50 kDa durante 24 h, haciendo recambios de agua a las 4 y 6 h. El pH final de la suspensión de partículas fue de 6.2. Para la caracterización fisicoquímica y biológica se utilizaron partículas recién elaboradas.

2.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El análisis se llevó a cabo a temperatura ambiente en un modo sin contacto, utilizando un microscopio de fuerza atómica JEOL (Scanning Probe Microscope, Model JSPM 4210, Japan) equipado con un silo en voladizo NSC15 de MikroMasch (MikroMasch, Portland, USA). Antes del análisis, se colocó una gota de la suspensión de partículas de CS-Crg sobre una mica y se dejó secar bajo condiciones atmosféricas. Se realizaron mediciones de altura y tamaño de sección transversal a partir de las imágenes de AFM, utilizando el software WSxM, versión 4.0, de Nanotec Electronica S.L. (Madrid, España) (Horcas y col., 2007).

2.6 Tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad

La distribución de tamaños, el potencial Z y el grado de polidispersidad de las partículas se determinó mediante análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS), utilizando un equipo Mobius (Wyatt Technologies, USA). El sistema consta de un láser Mobius simple a temperatura controlada de 25°C y modo longitudinal de 45 mW, operado a 532 nm y un ángulo de dispersión de $\Theta = 163.5^\circ\text{C}$ (Hernández-Téllez y col., 2017). El análisis de los datos experimentales se llevó a cabo en el software

Dynamics 7.3.1.15 (Wyatt Technology Corporation, USA).

2.7 Análisis FT-IR

Las partículas elaboradas por complejación iónica, así como cada componente por separado, fueron liofilizadas previamente. El análisis de FT-IR se realizó en un rango espectral de 4000-400 cm^{-1} (Thermo Scientific Nicolet iS50FT-IR), a fin de determinar las interacciones entre los componentes CS, LZ y Crg de las partículas (Hernández-Téllez y col., 2017).

2.8 Porcentaje de eficiencia de asociación de proteína

La eficiencia de asociación de proteína a las partículas de quitosano-carragenina se determinó mediante diferencia, a partir del porcentaje de la lisozima (no ligada) cuantificada en la solución (después de dializar las partículas) con respecto a la cantidad inicial de lisozima adicionada en la formulación (Grenha y col., 2010). La cuantificación de la proteína se llevó a cabo utilizando la reacción con el ácido bicinchonínico mediante el kit de ensayo de proteínas micro BCA (Pierce, USA), empleando albúmina sérica de bovino como estándar. Se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50, Varian, CA, USA). El porcentaje de la eficiencia de asociación de las partículas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de asociación (\%)} = \frac{\text{Cantidad total de proteína} - \text{Cantidad de proteína libre}}{\text{Cantidad total de proteína}} \times 100 \quad (1)$$

2.9 Liberación de lisozima de las partículas

El análisis de la liberación de proteína de las partículas de CS-Crg cargadas con LZ se llevó a cabo mediante pruebas *in vitro*. A un stock de 6 mL de muestra de partículas se le agregaron 6 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 M (pH 6) y la mezcla se incubó a 25°C durante 4 semanas, con agitación diaria por 30 min. Cada tercer día se tomó una alícuota para determinar la cantidad de proteína liberada al medio. Para la cuantificación se siguió el procedimiento indicado en el manual del proveedor (Kit micro BCA, Pierce, USA); se realizó una curva estándar empleando albúmina sérica bovina y se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50; Varian; CA, USA) (Grenha y col., 2010). Cada muestra se analizó por triplicado.

2.10 Mutagenicidad

Se utilizó la prueba estándar de Ames (Maron y Ames 1983) para probar el potencial mutagénico de las partículas de CS-Cgr y del complejo CS-Crg-LZ obtenidas por el método de complejación iónica. Las muestras se llevaron a una concentración final de partículas de 400, 300, 150 y 50 $\mu\text{g/mL}$, utilizando agua MiliQ estéril como diluyente. La mutagenicidad de las partículas se determinó mediante

el procedimiento de incorporación de placa estándar descrito por Maron y Ames (1983), empleando una solución de azida de sodio (1 $\mu\text{g/mL}$) como control positivo para la cepa TA100 y aflatoxina B1 (AFB1, 500 ng/placa) con activación metabólica (mezcla S9) para las cepas TA98 y TA100. Se llevaron a cabo tres repeticiones independientes de estos ensayos y por triplicado (Cruz-Ramírez y col., 2015; Hu y col., 2013).

2.11 Citotoxicidad

El efecto citotóxico de las partículas sobre la proliferación en células de la línea ARPE-19 se determinó utilizando el ensayo con MTT (Cell proliferation kit I, Roche, cat. No. 11-465-007-001). Brevemente, se colocaron 100 μL de medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Minimal essential medium) conteniendo 10,000 células en cada pocillo de una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano y se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 durante 24 h, para permitir la inserción de células. Enseguida, los cultivos se incubaron por otras 48 h después de añadir 100 μL de medio DMEM previamente adicionado con diferentes concentraciones de las partículas en suspensión. Las concentraciones finales de las suspensiones de partículas en el medio fueron de 400 - 50 μL , diluidas

en agua MiliQ. Se utilizó un control de células en medio DMEM, sin tratamiento. Antes de las últimas 4 h del cultivo celular, se añadieron 10 μ L de la solución de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo. Los cristales de formazán formados se disolvieron con solución de solubilización dodecilsulfato sódico (SDS). Después de un período de incubación de 15 h, las placas se leyeron en un lector de placas ELISA (Benchmark Microplate Reader; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm (López-Saiz y col., 2014).

2.12 Morfología celular

Para observar el efecto de las partículas sobre las células se llevaron a cabo tinciones con faloidina y DAPI. Las células se sembraron en microplacas de 96 pocillos, se incubaron por de 24 h y después se agregaron las suspensiones de las partículas a una concentración de 400 a 50 μ g/mL, volviendo a incubar por 48 h más. Posteriormente las células fueron fijadas con solución de formaldehído al 3.7% en PBS (búfer fosfato salino) y permeabilizadas mediante tratamiento con solución de tritón X-100 al 0.2% en PBS por 15 min. Finalmente, las células se tiñeron con isotiocianato de faloidin-tetrametilrhodamina B (Phalloidin-TRITC, péptido de *Amanita phalloides*, Sigma, cat. P1951) (1 μ L/99 μ L PBS) para observar su estructura celular por medio de la tinción de los microfilamentos de F-actina. La visualización del ADN se realizó utilizando el colorante dilactato de 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI dilactato, Sigma-Aldrich, cat. D9564) (68 μ mol) (Hinojosa y col., 2012). Todas las observaciones se llevaron a cabo en 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) y cámara enfriada DFC 450C (Leica). Las imágenes fueron procesadas utilizando el software overlay de fluorescencia (LAS AF versión 3.1.0, Leica Microsystem, USA).

2.13 Actividad antifúngica

Para evaluar la actividad antifúngica de las partículas de CS-Crg-LZ se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular por ensayo con XTT, usando microplacas de 96 pozos con fondo plano (Costar, Corning, Inc.). Se utilizó una suspensión de esporas de *Aspergillus parasiticus* a una concentración de $4 \times$

10^6 esporas/pozo; las esporas fueron resuspendidas en medio líquido Czapek y su concentración se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer. El método de XTT se basa en la reducción metabólica de la sal de tetrazolio 2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil-2H-tetrazolio-5-carboxanilida), XTT, por acción de la enzima succinato-deshidrogenasa, formando un compuesto de color naranja (formazán) (Meletiadiš y col., 2001). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Se preparó una solución de XTT a una concentración de 2 mg/mL en solución salina y se pasó a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.2 μ m (PALL Corporation, USA); asimismo se preparó una solución de menadiona 10 mM en acetona, la cual se llevó a una concentración de 1 mM tomando una alícuota de 1 mL y homogenizándola con 9 mL de solución salina. Además se utilizó una solución de lisozima (LZ) en agua. Para la determinación se añadieron 100 μ L de la suspensión de esporas a cada pocillo de la microplaca, incubando por 4 h en una incubadora (NOVATECH, USA) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Después se agregaron 100 μ L de la suspensión de partículas a cada pocillo (NP's de CS-Crg, CS-Crg-LZ y LZ en solución), obteniendo concentraciones finales de partículas de 400 - 50 μ g/mL. La placa se incubó por 4 h más, tras lo cual se añadió una alícuota de la mezcla XTT-menadiona. Posteriormente se añadieron 57.0 μ L de la mezcla XTT-menadiona y se incubó por otras 3 h, antes de leer la absorbancia en un espectrofotómetro de ELISA (Termolabsystem, China) a una longitud de onda de 450 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado y como controles se utilizaron placas adicionadas con agua y medio Czapek (Hernández-Téllez y col., 2017).

2.14 Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, en un diseño completamente al azar. Se realizó una comparación de medias por la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer a un intervalo de confianza de 95% usando el programa JMP (versión 10.0.0., SAS Institute Inc.). Todos los datos se presentaron como el valor de la media y su desviación estándar. La estimación de la concentración que inhibe la viabilidad de las esporas del hongo en un 50% (CI_{50}) se llevó a cabo mediante un análisis Probit, utilizando el programa NCSS (versión 2001, NCSS Statistical Software, USA). Este análisis se realizó a partir de los datos de la viabilidad de esporas de *Aspergillus parasiticus*.

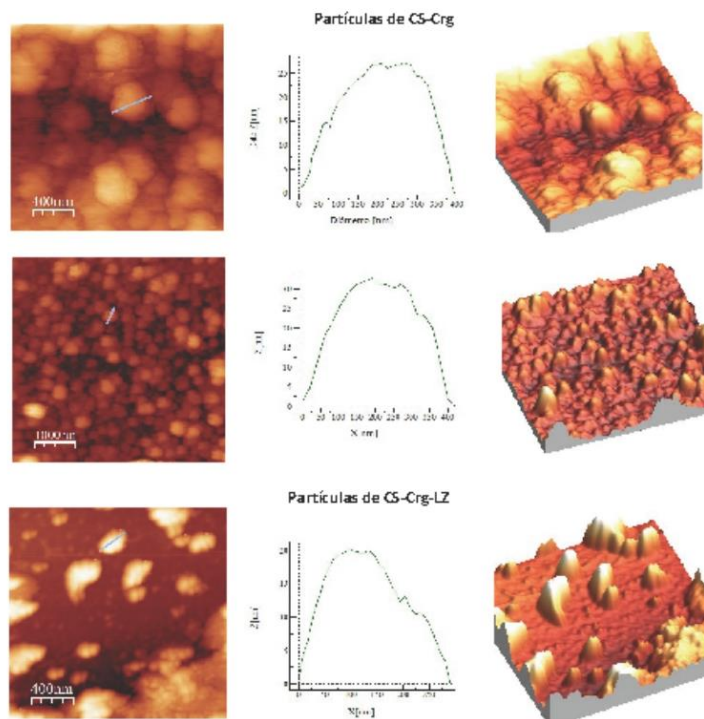


Fig. 1. Imágenes de las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ obtenidas por microscopía de fuerza atómica, AFM.

3 Resultados y discusión

3.1 Microscopía de fuerza atómica

En la Fig. 1 se muestran las imágenes por AFM de las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ elaboradas por complejación iónica. Al analizar el perfil de barrido en línea se encontró evidencia de similitud en la forma esférica, observando alturas de alrededor de 20-30 nm para ambos tipos de partículas. La adición de lisozima redujo el tamaño de las mismas, los cuales oscilaron entre los 400 y 250 nm para las NP's de CS-Crg y CS-Crg-LZ, respectivamente. En estudios previos, el análisis de microscopía electrónica de transmisión, TEM, reveló resultados similares para partículas de CS y CS-lisozima, en donde la reducción de tamaño de las últimas con respecto a las partículas control

(CS) se atribuyó a la capacidad de degradación del biopolímero por parte de la lisozima (Hernández-Téllez y col., 2017).

3.2 Tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad

Las partículas de CS-Crg y CS-Crg-LZ fueron analizadas por DLS para determinar el tamaño de partícula, el potencial Z y el grado de polidispersidad. De acuerdo a la gráfica de distribución de tamaños, las partículas de CS-Crg mostraron un comportamiento bimodal con tamaños que oscilaron entre los 725 ± 5.5 nm, observando además un pico de muy baja intensidad en el rango cercano a 100 nm. Con respecto a las partículas de CS-Crg-LZ, el análisis de DLS confirmó los resultados observados por AFM, encontrando una reducción de tamaño de alrededor del

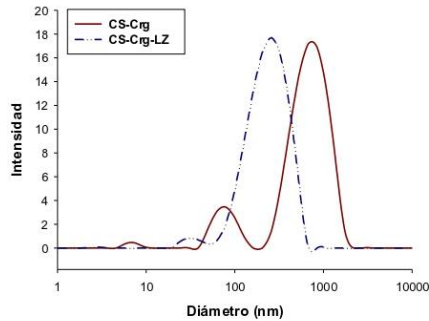


Fig. 2. Distribución de tamaños de las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ, obtenidos mediante análisis de DLS.

65%, al obtener partículas de 250 ± 8.1 nm (Fig. 2). Además de la actividad catalítica de la lisozima que le permite degradar al quitosano (Hernández-Téllez y col., 2017), la reducción de tamaño ocasionado por la adición de esta enzima se puede atribuir a factores como la polimerización o reticulación y reacomodo estructural de las cadenas de quitosano al momento de formarse las partículas (Grenha y col., 2010), por efecto de la proteína presente. En estudios anteriores, al acoplar lisozima a una matriz de quitosano, el tamaño final de las partículas fue menor comparado con el de la matriz del polímero sin lisozima (Rodríguez y col., 2012; Grenha y col., 2010).

Al analizar el índice de polidispersidad, el cual indica la variación que existe entre los tamaños de las partículas contenidas en la suspensión, se encontraron valores de 0.5 y 0.2 para las NP's de CS-Crg y de CS-Crg-LZ, respectivamente. Estos valores muestran que existe una menor variación entre los tamaños de las partículas de CS-Crg-LZ con respecto a las partículas control de CS-Crg. Este hecho se puede explicar en términos de interacciones electrostáticas entre los componentes de las matrices poliméricas de los materiales, además de la acción enzimática de la lisozima sobre las cadenas de quitosano (Deng y col., 2006), ya que es capaz de degradar y uniformizar las cadenas del biopolímero, lo que puede favorecer la obtención de partículas de tamaño uniforme. Con relación al potencial Z, las partículas de CS-Crg mostraron un valor de $+ 28.7 \pm 1.0$, mientras que la carga superficial de las partículas de CS-Crg-LZ fue de $+ 21.6 \pm 0.8$. La ligera disminución del potencial Z se puede asociar a una reducción en la cantidad de grupos funcionales como los grupos

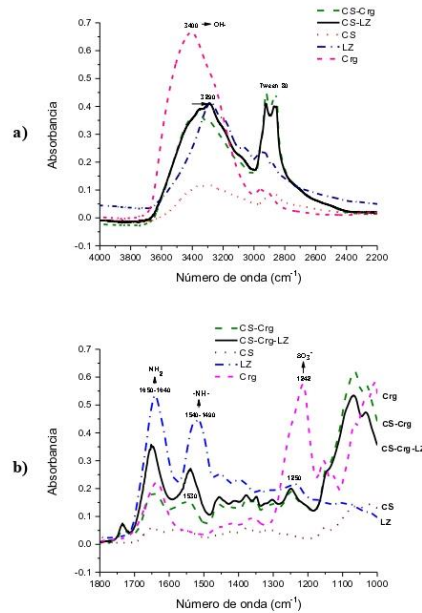


Fig. 3. Análisis de FT-IR de las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ.

amino libres (cargados positivamente) en las cadenas de quitosano al momento de adicionar la lisozima, originado por las interacciones electrostáticas entre los dos compuestos. Tomando en cuenta que el potencial Z de una suspensión estable de partículas debe estar por encima de $+ 20$ mV (Kiaie y col., 2016), los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el método de síntesis utilizado es adecuado para obtener suspensiones estables de partículas de CS-Crg, con y sin lisozima.

3.3 Análisis de FT-IR

Para determinar las posibles interacciones y así como las posibles formaciones de nuevos grupos entre los componentes que conforman las partículas, se realizó un análisis de FT-IR tanto de las partículas sintetizadas como a cada uno de sus componentes (Fig. 3).

De acuerdo a la literatura, las bandas que se pueden apreciar en mayor medida para la identificación de proteínas son las amidas I (NH_2) y II ($-\text{NH}-$), que son características entre los $1650\text{-}1640$ y $1540\text{-}1490$ cm^{-1} , respectivamente. La presencia de estas bandas

es común en la lisozima nativa (Hashemi y col., 2014). Por su parte, el quitosano muestra 3 principales bandas según su composición estructural, identificándose la amida I, amida II y uniones glicosídicas (Grenha y col., 2010; Rodrigues y col., 2012); estas bandas se pudieron observar e identificar en el espectro a los 1651, 1595-1575 y 1082-1074 cm^{-1} , respectivamente.

Los grupos sulfato (SO_4^-) de la carragenina son los principales que interactúan y su banda característica, que se observa generalmente a los 1242 cm^{-1} , se vio disminuida al formarse la matriz de la partícula. Sin embargo, esta banda se observa presente tanto en el complejo CS-Crg-LZ como en las partículas de CS-Crg, mostrando un ligero desplazamiento alrededor de los 1250 cm^{-1} . Respecto a la lisozima, en la región de 1540 cm^{-1} se evidenció una reducción en la absorbancia de la banda, lo cual sugiere una disminución de los grupos amino que posiblemente pudieron interactuar con el CS. Estos resultados permiten confirmar la presencia de lisozima y carragenina asociadas en las partículas elaboradas a base de quitosano.

3.4 Porcentaje de eficiencia de asociación de proteína

La eficiencia de asociación entre la lisozima y el quitosano en la matriz de las partículas de CS-Crg-LZ se determinó indirectamente mediante diferencia, a partir de los datos de la cuantificación de la lisozima en solución (no ligada). Se encontró un porcentaje de asociación de la lisozima a la matriz de quitosano-carragenina de $70 \pm 1.7\%$, lo cual sugiere la inmovilización y atrapamiento de la enzima en las partículas de CS-Crg-LZ.

Este valor es mayor comparado con los reportados por otros autores, que han obtenido valores entre 11.4 a 47.3% de lisozima inmovilizada mediante la técnica de formación de policomplejos iónicos, con diferente concentración de quitosano (0.5-3.5 mg/mL) y TPP (1-4 mg/mL) (Deng y col., 2006). En un estudio similar, al elaborar partículas de CS-Crg cargadas con ovoalbúmina mediante el método de complejación iónica, se encontró una variación en el porcentaje de asociación de la proteína del 12 a 18%, utilizando una concentración inicial de ovoalbúmina de 10, 20 y 30%, con una proporción de 3.5:1 de CS:Crg (Grenha y col., 2010). Asimismo, en partículas de CS cargadas con lisozima elaboradas por formación de policomplejos iónicos se reportaron valores de 8.3 y 10.0% de capacidad de cargado y eficiencia de encapsulación, respectivamente (Piras y col., 2014). Es posible que las

interacciones llevadas a cabo en el seno de la matriz de quitosano hayan sido propiciadas por atracciones electrostáticas, a través de los grupos sulfato (SO_4^-) característicos de la carragenina (Grenha y col., 2010), los cuales pueden formar interacciones con los grupos cargados positivamente de la lisozima, además de las interacciones que ocurren con el quitosano a través de los grupos amino ($-\text{NH}_2$) disponibles (Xu y Du, 2003).

En el presente estudio, es posible que en la matriz polimérica de CS-Crg-LZ la carragenina funcione como un agente entrecruzante o ligando entre el quitosano y la lisozima, siendo estos dos últimos los polímeros positivos y la carragenina el negativo, permitiendo la inmovilización de la lisozima en la matriz de quitosano dando estabilidad a las partículas formadas (Grenha y col., 2010). Se ha reportado que la carragenina es un mejor polímero de atrapamiento en comparación con otros agentes entrecruzantes utilizados frecuentemente en la industria alimentaria, entre los que destacan el ácido láctico y la enzima α -galactosidasa (Datta y col., 2013).

Por otra parte, se ha reportado que los compositos en forma de rosario o partícula esférica pueden atrapar el doble de enzimas comparado con otras formas estructurales del quitosano, más aún si el sistema se lleva a cabo en condiciones acuosas (en solución); de este modo es posible obtener un alto grado de atrapamiento de la proteína debido a su alta hidrofobicidad y porosidad, además de la presencia de los grupos amino e hidroxilo, que pueden ligar fácilmente a la enzima (Chang y Juang, 2007). Los principales grupos funcionales involucrados en la asociación de los compuestos utilizados para elaborar las partículas de CS-Crg-LZ pueden corresponder a los grupo hidroxilo y amino disponibles del quitosano, grupos sulfato de la carragenina y de la lisina e histidina de la lisozima, permitiendo así una alta asociación de proteína en las partículas de este estudio.

3.5 Liberación de lisozima de las partículas

Con el fin de determinar el comportamiento de la liberación de la LZ en las partículas de CS-Crg-LZ, se procedió a cuantificar la cantidad de enzima presente en la solución del medio. El ensayo se llevó a cabo en medio buffer acetato de sodio a un pH de 6.0, óptimo para la actividad de la LZ (Lee y Yang 2002). Al analizar la cinética de liberación de LZ de las partículas, se observó una liberación del 5% de enzima a un tiempo inicial $t = 0$ (Fig. 4), lo cual puede atribuirse a la LZ que se encuentra adsorbida en la

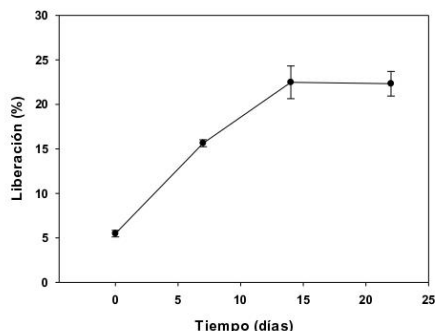


Fig. 4. Perfil de liberación *in vitro* de la lisozima de las partículas de CS-Crg-LZ en buffer acetato de sodio (pH=6.0).

superficie de las partículas (desorción) (Piras y col., 2014).

Posterior a la desorción inicial, es factible que los mecanismos de liberación sean distintos a la desorción, como por ejemplo la difusión, que permite una liberación lenta del compuesto y puede corresponder a la lisozima que se encuentre asociada de manera más eficaz a la matriz biopolimérica (Deng y col., 2006).

Se observó un incremento en la liberación de la lisozima contenida en las partículas de CS-Crg-LZ hasta los 15 días, manteniéndose constante entre los 15 y 20 días con un valor máximo de liberación de $22.5 \pm 1.8\%$. Se ha reportado que los mecanismos de liberación en estas fases están relacionados con el hinchamiento de la partícula una vez que llega al equilibrio con el medio, para finalmente pasar al período de liberación lenta mediante procesos de difusión (Piras y col., 2014) o bien por la erosión de las partículas (Deng y col., 2006), lo cual explica el comportamiento observado en el presente estudio.

3.6 Mutagenicidad

En los tratamientos control positivo de AFB1 y NaN_3 (para TA98 y TA100, respectivamente) indujeron un mayor número ($p < 0.05$) número de colonias revertantes por placa, siendo este de 526.6 ± 64.5 y 845.6 ± 51.0 revertantes/placa, respectivamente (Fig. 5). Esto indica que el ensayo fue llevado a cabo correctamente (Hu y col., 2013).

De acuerdo a lo esperado, ninguna de las

suspensiones de partículas presentó mutagenicidad a todas las concentraciones evaluadas (50-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El número de revertantes observadas en los tratamientos con las partículas fue menor comparado con el número de revertantes espontáneas y con el valor encontrado en el control positivo en ambas cepas, TA100 y TA98 (Fig. 5). Estos resultados son consistentes con estudios anteriores, en donde se ha reportado que el quitosano posee baja o nula toxicidad (Baldrick, 2010; Hu y col., 2013; Lee y col., 2004).

Experimentos previos han demostrado que las nanomiscelas de quitosano (95% DD) con ácido esteárico presentaron valores de 24 ± 1 y 22 ± 2 colonias revertantes/placa para la cepa TA98 con y sin S9, respectivamente, mientras que para la cepa TA100 se reportaron valores de 194 ± 24 y 226 ± 9 revertantes/placa en los medios con y sin S9, respectivamente, los cuales son similares a los encontrados en este estudio. Al evaluar el potencial mutagénico del quitosano en solución se encontraron valores entre 23 ± 4 y 28 ± 4 (+S9) revertantes/placa para ambas cepas, lo cual indica que tanto el quitosano en solución como las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ sintetizadas, no presentan actividad mutagénica al no ser capaces de revertir la mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium*, ni por sustitución de pares de bases (base-pair substitution) ni por cambio o desplazamiento en el marco de lectura (frameshift) (Hu y col. 2013).

Algunos estudios han reportado resultados positivos para el quitosano y sus derivados. Al evaluar la antimutagenicidad de dos distintos tipos de quitooligosacáridos (I y II) se observó que estos no inhibieron la actividad mutagénica de mutágenos de acción directa, NaN_3 (azida de sodio) para TA100 y NAD (4-nitro-o-fenilendiamina) para TA98. Sin embargo, si inhibieron la actividad de mutágenos de acción indirecta, benzo[a]pireno (B[a]P) para TA100 y 2-aminofluoreno (2-AF) para TA98, encontrando valores de inhibición de 10-51% al agregar 1 mg de quitooligosacáridos (I y II). Los resultados revelaron que los quitooligosacáridos contienen algún antimutágeno capaz de inhibir la mutagenicidad de mutágenos indirectos, aunque el mecanismo aún es desconocido (Nam y col., 2001). Además, en un estudio no estandarizado, se encontró que la glucosamina (sal de hidrocloreuro) resultó ser no genotóxica en el ensayo de mutación reversa bacteriana (Ames), utilizando *S. typhimurium* (cepas TA98, TA100, TA1537 y TA1537) y *E. coli* (cepa WP2uvrA) (Anderson y col., 2005).

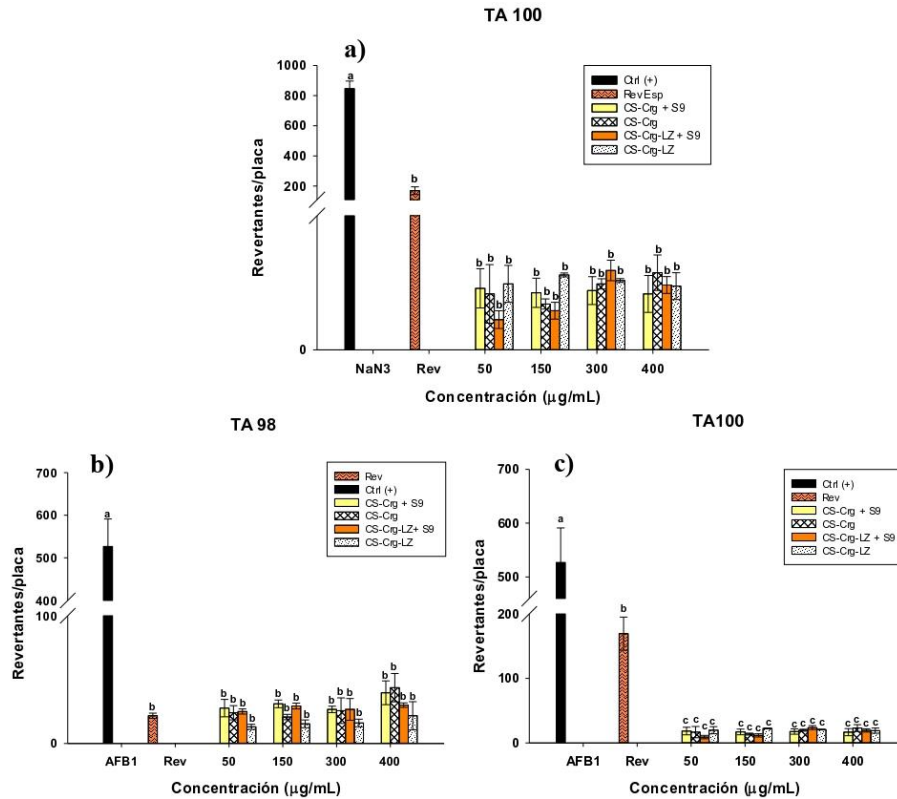


Fig. 5. Número total de colonias revertantes por placa de las partículas de CS y de CS-Crg-LZ para las cepas TA98 y TA100. El control positivo fue AFB1 para TA98 y NaN_3 para la TA100. Los resultados son promedio de triplicados. Letra distinta en barras indica diferencia significativa por tratamiento. Rev: revertantes espontáneas.

Las evidencias experimentales anteriores apoyan la bioseguridad asociada a las partículas elaboradas a base de quitosano; sin embargo, es necesario realizar otros estudios a fin de corroborar la seguridad e inocuidad de estos materiales en términos de toxicidad y mutagenicidad, lo cual cuadyuvará a elucidar los mecanismos de acción implicados.

3.7 Citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad de las partículas de CS-Crg y CS-Crg-LZ se utilizaron células de la línea

ARPE-19. Se determinó el efecto sobre la viabilidad celular, cuantificando la formación de la sal de formazán por la actividad enzimática mitocondrial de células vivas, a una longitud de onda de 570 nm. La cantidad de esta sal es proporcional a la cantidad de las células viables en el medio (Hu y col., 2013). Se evaluó el efecto de las partículas y de los compuestos por separado, con la finalidad de analizar el posible efecto adverso sobre células sanas humanas. Los resultados obtenidos evidenciaron que no existen diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos, encontrando una proliferación del 100 %

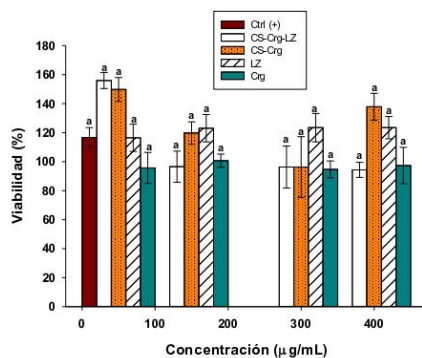


Fig. 6. Efecto de las partículas de CS-Crg, CS-Crg-LZ y soluciones de LZ y Crg en la viabilidad de células ARPE-19 en medio DMEM.

en todas las muestras analizadas en comparación con las células inoculadas en el control (medio DMEM) (Fig. 6). Por el contrario, las células expuestas a la lisozima (en solución) y a las partículas de CS-Crg mostraron un incremento en la viabilidad comparado con el control, lo que indica que tanto estas partículas como la enzima son capaces de promover en mayor medida la proliferación celular (aproximadamente en un 20-30%). Este efecto fue más evidente en el medio adicionado con la menor concentración (50 µg/mL) de partículas de CS-Crg, observándose incluso también en el tratamiento con las partículas de CS-Crg-LZ a la misma concentración.

Grenha y col. (2010) reportaron resultados similares al evaluar citotoxicidad *in vitro* de nanopartículas de CS-Cgr (a concentraciones de 0.1, 1 y 3 mg/mL) sobre células de la línea L929 (fibroblastos de ratón) expuestas durante 1, 3 y 7 días a las NP's. Los autores no encontraron evidencia de un efecto significativo sobre la viabilidad celular en comparación con las células incubadas en el medio de cultivo control, observando una viabilidad celular por encima del 80% (Grenha y col., 2010). Esto sugiere que las partículas de CS-Crg no son citotóxicas a las concentraciones probadas en este estudio.

Con relación a la citotoxicidad de biocompuestos de quitosano, estudios con nanomicelas de oligosacáridos de quitosano con ácido esteárico injertado demostraron que estas disminuyen la viabilidad de células de carcinoma de pulmón humano, encontrando un efecto dependiente de la concentración y tiempo, con un valor de IC_{50} (50%

de inhibición) de 202.38, 157.13 y 70.84 µg/ml a las 12, 24 y 48 h, respectivamente (Hu y col., 2013).

En estudios similares utilizando NP's de iones metálicos de Fe_3O_4 recubiertas con oligosacáridos de quitosano (CSO-INP's), Shukla y col. (2015) reportaron que estas no presentan toxicidad significativa en células normales de riñón embrionario humano (HeK293) a concentraciones de 0.5 a 4 µg/mL, en comparación con las nanopartículas de Fe sin recubrimiento (INPs), las cuales causaron efectos tóxicos a las mismas concentraciones. De acuerdo a los autores, la reducción de la toxicidad de las partículas de CSO-INP's se puede atribuir a la liberación controlada de los iones Fe^{2+} que el revestimiento de quitosano permite, mediando así la muerte celular por especies reactivas al oxígeno, ROS (Shukla y col., 2015).

3.8 Morfología celular

Para visualizar los daños ocasionados por la exposición a las NP's sobre las células ARPE-19 se llevaron a cabo tinciones con fluorocromos a fin de observar el efecto sobre la estructura celular (filamentos de actina) y el ADN, utilizando faloidina y DAPI, respectivamente.

Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia revelaron que ninguno de los tratamientos ocasionó daños o cambios significativos en el ADN, ni en los filamentos de actina con respecto al control (medio DMEM), a las 48 h (Fig. 7). No se encontraron alteraciones evidentes en comparación con el control; no se observaron características o datos que indicaran la presencia de necrosis o apoptosis, tales como dilatación y desintergación o condensación y fragmentación (Hengartner, 2000). Igualmente los filamentos de actina se observaron íntegros respecto al control. Estos resultados sugieren que las NP's de CS-Crg y CS-Crg-LZ presentan una baja o nula citotoxicidad cuando son expuestas a células sanas de humano.

3.9 Actividad antifúngica

Diversos estudios han demostrado la actividad del quitosano contra el crecimiento de varias especies de hongos. Este efecto varía en función de la especie de microorganismo, la fuente del biopolímero, la concentración y propiedades fisicoquímicas del mismo, entre otras, las cuales en conjunto determinan la presencia de un efecto fungicida o fungistático (Cota-Arriola y col., 2011; Kong y col., 2010).

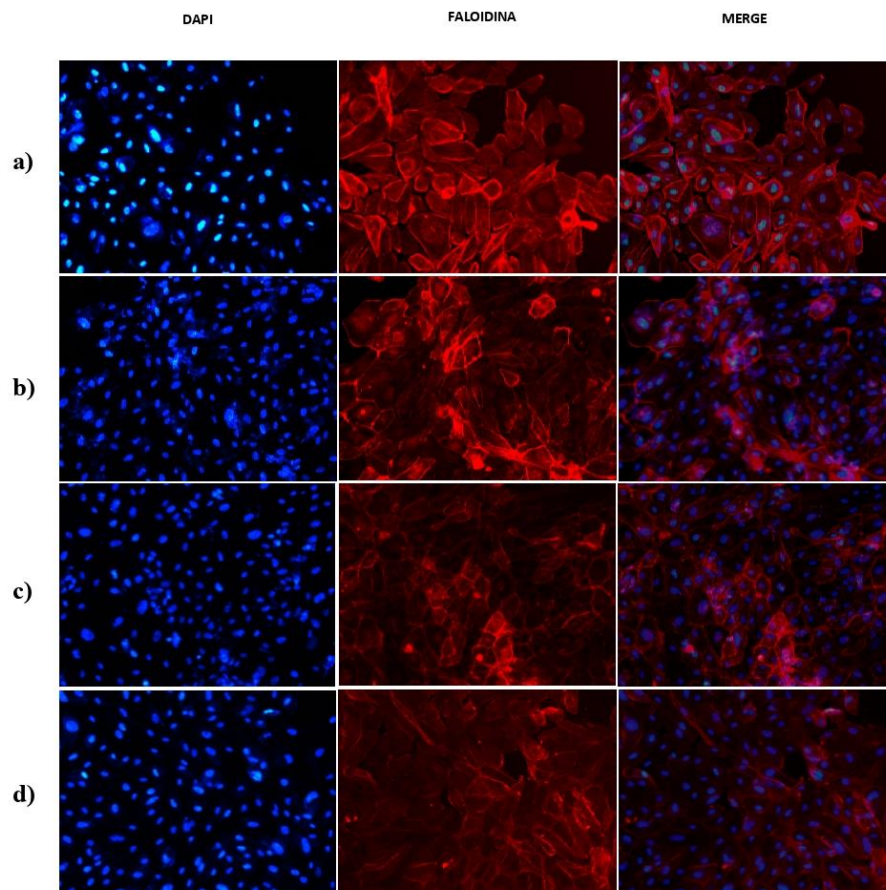


Fig. 7. Efecto de las partículas de Cs-Crg, CS-Crg-LZ y lisozima en cambios morfológicos de células ARPE en medio DMEM, a las 48 h. Visualización del citoesqueleto de actina de la membrana teñido con faloidina (rojo), ADN teñido con DAPI (azul), merge (traslapamiento de ambas imágenes). Control agua. a) Control; b) CS-Crg-LZ; c) CS-Crg; d) Lisozima.

Se ha reportado que el efecto inhibitorio del quitosano (80.9-89.7% DD) sobre *Aspergillus parasiticus* es fungistático, encontrando una disminución en la velocidad de crecimiento radial y una CI_{50} de 6.71 g/L, a las 122 h (Cota-Arriola y col., 2011). Se encontró un efecto similar al utilizar micro y nanopartículas de CS (0.2, 0.35 y 0.5%) con

TPP (10%), las cuales inhibieron fuertemente (53.78 ± 1.47 a 77.02 ± 1.47 %) la germinación de esporas de *A. parasiticus* comparado con el quitosano en solución, a las mismas concentraciones (Cota-Arriola y col., 2013a).

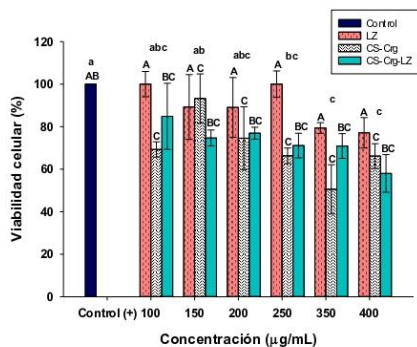


Fig. 8. Efecto de la viabilidad celular sobre esporas de *Aspergillus parasiticus* de la solución de lisozima y las partículas de CS-Crg y CS-Crg-LZ. Letras distintas en mayúscula indican diferencia significativa por tratamientos, letras distintas en minúscula indican diferencia significativa por concentración ($p < 0.05$).

Algunas especies de *Aspergillus* tales como *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. ustus* (Meletiadi y col., 2001) y *A. parasiticus* (Luque-Alcaraz y col., 2016), han demostrado tener la habilidad de reducir la sales de tetrazolio en presencia de menadiona como agente de acoplamiento de electrones. En este estudio, al determinar el efecto de las partículas sobre la viabilidad de esporas de *A. parasiticus* se encontró que las partículas de CS-Crg presentaron un mayor ($p < 0.05$) efecto inhibitorio sobre la viabilidad a una concentración de 350 µg/mL, observando un 50 % de esporas viables. Las partículas de CS-Crg-LZ ocasionaron una mayor mortalidad de células fúngicas a una concentración de 400 µg/mL, encontrando una viabilidad de 60% respecto al control (Fig. 8). No se observaron diferencias importantes en los valores estimados de CI_{50} , los cuales fueron de 870.25 ± 252.90 y 896.35 ± 211.51 µg/mL para las partículas de CS-Crg y CS-Crg-LZ, respectivamente. Estas concentraciones fueron utilizadas para los ensayos posteriores.

En un estudio previo se evaluó el efecto inhibitorio de partículas de quitosano con y sin lisozima sobre el crecimiento de *A. parasiticus*, observando una viabilidad celular de 48 y 18% cuando el hongo se expuso a las NP's de CS y CS-LZ, respectivamente, a una concentración de 300 µg/mL (Hernández-Téllez y col., 2017). Además del tamaño de partícula (entre 11.8 - 13.4 nm) y del método de elaboración de las

NP's (nanoprecipitación), la baja cantidad de esporas viables se explicó en términos de un posible efecto sinérgico entre el CS y la lisozima, además de la capacidad catalítica de la lisozima sobre el CS, lo que puede favorecer la producción de quitoooligómeros de bajo peso molecular con alta actividad antimicrobiana (Zimoch-Korzycza y col., 2015). El método de elaboración de las nanopartículas es un parámetro que afecta la actividad antifúngica, que se puede relacionar con diferencias en el material resultante (por ejemplo, el tamaño de partícula) (Agnihotri y col., 2004; Cota-Arriola y col., 2013b), lo que explica las diferencias encontradas en el presente estudio.

Conclusiones

En este estudio se logró la síntesis de partículas de quitosano-carragenina y quitosano-carragenina-lisozima, con actividad antifúngica contra *A. parasiticus*. Ambos tipos de partículas exhibieron un mayor ($p < 0.05$) efecto inhibitorio sobre la viabilidad del hongo con respecto al control, encontrando un mayor efecto al aumentar la concentración de partículas en el medio. Además, ambas partículas no presentaron potencial mutagénico ni citotóxico en células humanas sanas de la línea ARPE-19. El método de complejación iónica puede ser utilizado para la síntesis de sistemas biopoliméricos cargados con compuestos naturales antimicrobianos como la lisozima, cuya incorporación en la matriz biopolimérica coadyuva al control de microorganismos de importancia en alimentos, incrementando el potencial antimicrobiano del quitosano. Estos resultados sugieren que las partículas son seguras y constituyen una alternativa viable para aplicaciones en sistemas biológicos, siendo posible la obtención de materiales biopoliméricos de CS-Crg-LZ con actividad antifúngica prolongada contra hongos toxigénicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por el apoyo otorgado a través del proyecto No. 219786 y por la beca para estudios de posgrado de Cynthia Nazareth Hernández-Téllez. Se agradece a los Dres. Aarón de Jesús Rosas Durazo de Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V. y Jesús Daniel Fernández Quiroz del CIAD Hermosillo, por su apoyo para la realización de los análisis de

MFA y DLS, respectivamente. Asimismo, se agradece al M. en B. Edgar Sandoval Petris de la Universidad de Sonora y al M.C. Joel Said García Romo por su apoyo en los análisis de citotoxicidad.

Referencias

- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N. y Aminabhavi T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100, 5-28.
- Anderson, J., Nicolosi, R. y Borzelleca, J. (2005). Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food and Chemical Toxicology* 43, 187-201.
- Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56, 290-299.
- Bautista-Baños, S., González-Soto, R. y Ramos-García, M. L. (2017). Physical properties of chitosan films with lemon essential oil added and their impact on the shelf life of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17, 1-11.
- Cai, C., Bakowsky, U., Rytting, E., Schaper, A. K. y Kissel, T. (2008). Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 31-42.
- Chang, M. Y. y Juang, R. S. (2007). Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. *Biochemical Engineering Journal* 35, 93-98.
- Chávez-Magdaleno, M. E., Luque-Alcaraz, A. G., Gutiérrez-Martínez, P., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J. y Plascencia-Jatomea, M. (2018). Effect of chitosan-pepper tree (*Schinus molle*) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17, 29-45.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Lizardi-Mendoza, J., Burgos-Hernández, A., Robles-Sánchez, R. M. y Plascencia-Jatomea, M. (2013a). Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *Journal of Polymers and the Environment* 21, 971-980.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Ezquerra-Brauer, J. M. y Plascencia-Jatomea, M. (2013b). Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 1525-1536.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., López-Franco, Y. L. y Plascencia-Jatomea, M. (2011). Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polymer International* 60, 937-944.
- Datta, S., Christena, L. R. y Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3, 1-9.
- Deng, Q. Y., Zhou, C. R. y Luo, B. H. (2006). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical Biology* 44, 336-342.
- Elgadir, M. A., Uddin, M. S., Ferdosh, S., Adam, A., Chowdhury, A. J. K. y Sarker, M. Z. I. (2015). Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* 23, 619-629.
- Grenha, A., Gomes, M. E., Rodrigues, M., Santo, V. E., Mano, J. F., Neves, N. M. y Reis, R. L. (2010). Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 92, 1265-1272.
- Hashemi, M. M., Aminlari, M. y Moosavinasab, M. (2014). Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme-xanthan gum conjugate. *LWT- Food Science and Technology* 57, 594-602.

- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hernández-Téllez, C. N., Rodríguez-Córdova, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Crotez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., Torres-Arreola, W., Martínez-Higuera, A. y Plascencia-Jatomea, M. (2017). Activity of chitosan-lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1, 3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech* 7, 279.
- Hinojosa, C., Jara, M., Diez, D. y Marcelain, K. (2012). Efecto de la proteína Ski sobre la susceptibilidad de células MCF-7 a la muerte inducida por docetaxel. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile* 23, 283-90.
- Horcas, I., Fernández, R., Gomez-Rodriguez, J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. y Baro A. (2007). WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments* 78, 013705.
- Hu, P., Wang, T., Xu, Q., Chang, Y., Tu, H., Zheng, Y., Zhang, J., Xu, Y., Yang, J., Yuang, H., Hu, F. y Zhu, X. (2013). Genotoxicity evaluation of stearic acid grafted chitosan oligosaccharide nanomicelles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 751, 116-126.
- Huang, W., Xu, H., Xue, Y., Huang, R., Deng, H. y Pan, S. (2012). Layer-by-layer immobilization of lysozyme-chitosan-organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Research International* 48, 784-791.
- Ibrahim, H. R., Matsuzaki, T. y Aoki, T. (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Letters* 506, 27-32.
- Kiaie, N., Emami, S. H., Tafti, S. H. y Aghdam, R. M. (2016). Statistical optimization of chitosan nanoparticles as protein vehicles, using response surface methodology. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* 14, 413-422.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. y Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144, 51-63.
- Lee, K. Y., Shibutani, M., Takagi, H., Arimura, T., Takigami, S., Uneyama, C., Kato, N. y Hirose, M. (2004). Subchronic toxicity study of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 42, 687-695.
- Lee, Y. C. y Yang, D. (2002) Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry* 310, 223-224.
- Li, L., Ni, R., Shao, Y. y Mao, S. (2014). Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 103, 1-11.
- López-Saiz, C. M., Velázquez, C., Hernández, J., Cinco-Moroyoqui, F. J., Plascencia-Jatomea, M., Robles-Sánchez, M., Machi-Lara, L. y Burgos-Hernández, A. (2014). Isolation and structural elucidation of antiproliferative compounds of lipidic fractions from white shrimp muscle (*Litopenaeus vannamei*). *International Journal of Molecular Sciences* 15, 23555-23570.
- Luque-Alcaraz, A. G., Cortez-Rocha, M. O., Velázquez-Contreras, C. A., Acosta-Silva, A. L., Santacruz-Ortega, H. C., Burgos-Hernández, A., Argüelles-Monal, W. M. y Plascencia-Jatomea, M. (2016). Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *Journal of Nanomaterials* 2016, 6060137, 1-10.
- Maron, D. M. y Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella mutagenicity* test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 113, 173-215.
- Meletiadis, J., Mouton, J. W., Meis, J. F., Bouman, B. A., Donnelly, J. P., Verweij, P. E. y Network, E. (2001). Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3402-3408.
- Nam, K. S., Choi, Y. R. y Shon, Y. H. (2001). Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu test. *Biotechnology Letters* 23, 971-975.
- Pérez-Alonso, C., Campos-Montiel, R. G., Morales-Luna, E., Reyes-Munguía, A., Aguirre-Alvarez, G. y Pimentel-González, D. J. (2015) Stabilization of phenolic

- compounds from *Opuntia oligacantha* Först by microencapsulation with agave sap (aguamiel). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 579-588.
- Piras, A. M., Maisetta, G., Sandreschi, S., Esin, S., Gazzarri, M., Batoni, G. y Chiellini, F. (2014). Preparation, physical-chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules* 67, 124-131.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 25, 78-82.
- Prabaharan, M. (2015). Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 1313-1322.
- Rodríguez, S., da Costa, A. M. R. y Grenha, A. (2012). Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers* 89, 282-289.
- Rosales-Martínez, P., García-Pinilla, S., Arrollo-Maya, I. J., Hernández-Sánchez, H. y Cornejo-Mazón, M. (2017). Optimization of the conditions for the elaboration of chitosan nanoparticles charged with alpha lipoic acid, ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16, 319-335.
- Shukla, S., Jadaun, A., Arora, V., Sinha, R. K., Biyani, N. y Jain, V. (2015). *In vitro* toxicity assessment of chitosan oligosaccharide coated iron oxide nanoparticles. *Toxicology Reports* 2, 27-39.
- Sotelo-Boyás, M. E., Valverde-Aguilar, G., Plascencia-Jatomea, M., Correa-Pacheco, Z. N., Jiménez-Aparicio, A., Solorza-Feria, J. y Bautista-Baños, S. (2015). Caracterización de nanopartículas de quitosano adicionadas con aceites esenciales: Efecto *in vitro* en *Pectobacterium carotovorum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 589-599.
- Xu, H., Nobile, C. J. y Dongari-Bagtzoglou, A. (2013). Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PloS One* 8, 63736.
- Xu, Y. y Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 250, 215-226.
- Zimoch-Korzycka, A., Gardrat, C., Castellan, A., Coma, V. y Jarmoluk, A. (2015). The use of lysozyme to prepare biologically active chitooligomers. *Polímeros* 25, 35-41.

CONCLUSIONES

En este estudio se logró la síntesis y caracterización fisicoquímica y biológica parcial de dos sistemas de bionanocompositos elaborados a base quitosano acoplados con lisozima. Los dos métodos utilizados para la síntesis de biocompositos fueron factibles para su obtención, nanoprecipitación (CS-LZ) y complejación iónica (CS-Crg-LZ). Al evaluar el efecto antifúngico se encontró que las partículas de CS-LZ tienen una mayor inhibición de la viabilidad celular sobre *A. parasiticus* comparado con las partículas de CS-Crg-LZ, mostrando además un efecto fungistático y una tendencia marcada de dosis-respuesta en ambas partículas en las concentraciones empleadas. Respecto a citotoxicidad, los resultados sugieren que las partículas de CS-Crg-LZ son seguras y citocompatibles al momento de estar en contacto con células sanas de retina humana (ARPE-19); además, la prueba de Ames mostró que no existe potencial mutagénico de los dos tipos de partículas.

Con estos hallazgos se puede concluir que estas partículas tienen un efecto antifúngico efectivo contra esporas de hongos patógenos como *Aspergillus parasiticus* y además son seguras en parámetros de citotoxicidad, mutagenicidad e inducción de cambios o alteraciones morfológicas para su utilización en contacto con humanos, animales o plantas. Sin embargo, se deben realizar estudios más detallados para poder elucidar los mecanismos de acción del efecto de las partículas sobre las esporas del hongo, para así poder entender el comportamiento y desarrollar materiales nanoestructurados de origen natural que puedan actuar de una forma más efectiva para controlar el crecimiento de hongos patogénicos que aquejan a la industria alimentaria. Estos sistemas nanoparticulados prometen ser una opción viable y segura para la aplicación en sistemas biológicos, sin repercusiones al ser humano y la biota. Los beneficios potenciales de la nanotecnología para la agricultura, la alimentación, la pesca, la acuicultura necesitan equilibrarse con las preocupaciones por el suelo, el agua, el medio ambiente y la salud ocupacional de los trabajadores.

RECOMENDACIONES

Analizar el efecto de estos biocompositos utilizando ensayos *in vivo*, a fin de conocer la seguridad y las posibles repercusiones al ser utilizadas en sistemas biológicos (agrícolas, alimentos, etc.) en donde se requiera controlar el desarrollo de microorganismos patógenos.

Incorporar en matrices de CS-Crg otros compuestos bioactivos antimicrobianos, evaluar la asociación/liberación del agente bioactivo y relacionarlo con la bioactividad.

Evaluar el efecto de las NP's elaboradas sobre organelos subcelulares, producción de glucanasas y biosíntesis de toxinas fúngicas, para esbozar los posibles mecanismos de acción involucrados.

PRODUCTOS

Este proyecto de tesis se presentó además en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

Presentación de la ponencia Bionanocompositos de quitosano/lisozima: mutagenicidad y efecto sobre la viabilidad celular de *Aspergillus parasiticus*, en el VII Simposio Iberoamericano de Quitina, llevado a cabo del 20 al 23 de abril del 2015, en Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

Presentación de la ponencia Chitosan Nanocomposites Coupled with Lysozyme: Effect of Cell Viability and Morphometry of *Aspergillus parasiticus*, presented in Latin Food 2016, held in Cancún Q. Roo, México. November 9-11, 2016.

Participación en la modalidad cartel con el trabajo: CHITOSAN/CARRAGEENAN/LYSOZYME BIOCOSCOMPOSITES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EFFECT ON THE VIABILITY OF *Aspergillus parasiticus* SPORES, en el 2do ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE EL QUITOSANO Y SUS APLICACIONES AGRÍCOLAS, llevado a cabo en Cuernavaca, Morelos del 13 al 15 de noviembre del 2017.

Presentación del cartel “Chitosan/carrageenan/lysozyme biocomposites: synthesis characterization and effect on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores” dentro de la XXII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales, realizada del 22 al 24 de noviembre de 2017 en Hermosillo, Sonora, México.



Sociedad Iberoamericana de Quitina
Sociedade Ibero-americana de Quitina
Iberoamerican Chitin Society

VII Simposio Iberoamericano de Quitina



Otorga la presente

CONSTANCIA

*C.N. Hernández-Téllez, M. Plascencia-Jatomea, A.G. Luque-Alcaraz,
A. J. Tánori-Córdova, M.O. Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández*

Por presentar la ponencia: Bionanocompositos de quitosano/lisozima: mutagenicidad y efecto sobre la viabilidad celular de *Aspergillus parasiticus*.

20-23 de abril de 2015 . Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

Galo Cárdenas
Dr. Galo Cárdenas Triviño
Consejo Directivo de la SIAQ



Maribel Plascencia
Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Presidenta del Comité Organizador



AMEPAL A.C.

Latin Food 2016

IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety
7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that the presentation entitled:
Chitosan Nanocomposites Coupled with Lysozyme: Effect of Cell Viability and Morphometry of *Aspergillus parasiticus*.

Authored by:

Hernández-Téllez, C.N., Rodríguez-Córdova, F.J., Martínez-Higuera, A.A., Cortez-Rocha, M.O., Lizardi-Mendoza, J., Plascencia-Jatomea, M.

Was presented in Latin Food 2016, held in Cancun Q. Roo,
México. November 9 - 11, 2016.

Dr. José Santos García Alvarado
President of AMEPAL

Dr. Hugo Sergio García Galindo
President of AMECA



UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN





2^º ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE EL QUITOSANO Y SUS APLICACIONES AGRÍCOLAS



Instituto Politécnico Nacional
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos
Otorga la Presente **Constancia**

A: Cynthia Nazareth Hernández-Tellez

Por haber participado en la modalidad CARTEL con el trabajo:
**'CHITOSAN/CARRAGEENAN/LYSOZYME BIOCOMPOSITES: SYNTHESIS,
CHARACTERIZATION AND EFFECT ON THE VIABILITY OF *Aspergillus parasiticus* SPORES**
(Mario Onofre Cortez-Rocha, Armando Burgos-Hernández, Jaime Lizardi-Mendoza, Jesús
Daniel Fernández-Quiroz, Maribel Plascencia-Jatomea)

en el "2º ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE EL QUITOSANO Y SUS APLICACIONES
AGRÍCOLAS", que se llevó a cabo del 13 al 15 de Noviembre del 2017, en Cuernavaca,
Morelos, México.


Dra. Gabriela Tréjo Tapia
Directora del CEPROBI


Dra. Silvia Bautista Baños
Organización



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Investigación en Física



Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

**C. N. Hernandez-Tellez, M. O. Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández,
J. Lizardi-Mendoza, J. D. Fernández-Quiroz, M. Plascencia-Jatomea**

Por presentar el Cartel "Chitosan/carrageenan/lysozyme biocomposites: synthesis, characterization and effect on the viability of *aspergillus parasiticus* spores" dentro de la XXII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales, realizada del 22 al 24 de noviembre de 2017.

Hermosillo, Sonora, México, a 24 de noviembre de 2017.

DR. MARTÍN R. PEDROZA MONTERO
Jefe Departamento de Investigación en Física



El saber de mis hijos
hará mi grandeza
DEPARTAMENTO
DE INVESTIGACIÓN
EN FÍSICA

DR. FELIPE RAMOS MENDIETA
Presidente del Comité Organizador

REFERENCIAS

- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*, 100(1), 5-28.
- Arora, A., & Padua, G. (2010). Nanocomposites in food packaging. *Journal of Food science*, 75(1).
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67-75.
- Cai, C., Bakowsky, U., Rytting, E., Schaper, A. K., & Kissel, T. (2008). Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 69(1), 31-42.
- Camacho Elizondo, M., Vega Baudrit, J., & Campos Gallo, A. (2011). Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(4), 292-306.
- Carreno-Gomez, B., & Duncan, R. (1997). Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 148(2), 231-240.
- Carrillo, W. (2013). Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actual. nutr*, 14(4), 314-326.
- Chae, S. Y., Son, S., Lee, M., Jang, M.-K., & Nah, J.-W. (2005). Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier. *Journal of Controlled Release*, 109(1), 330-344.
- Chung, Y.-C., & Chen, C.-Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource technology*, 99(8), 2806-2814.
- Chávez-Magdaleno, M. E., Luque-Alcaraz, A. G., Gutiérrez-Martínez, P., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., & Plascencia-

- Jatomea, M. (2017). EFFECT OF CHITOSAN-PEPPER TREE (*Schinus molle*) ESSENTIAL OIL BIOCOSMOS ON THE GROWTH KINETICS, VIABILITY AND MEMBRANE INTEGRITY OF *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 29-45.
- Cota-Arriola, O., Onofre Cortez-Rocha, M., Burgos-Hernández, A., Marina Ezquerra-Brauer, J., & Plascencia-Jatomea, M. (2013a). Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1525-1536.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Lizardi-Mendoza, J., Burgos-Hernández, A., Robles-Sánchez, R. M., & Plascencia-Jatomea, M. (2013b). Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(4), 971-980.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., López-Franco, Y. L., & Plascencia-Jatomea, M. (2011). Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polymer International*, 60(6), 937-944.
- De Azeredo, H. M. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food research international*, 42(9), 1240-1253.
- Deng, Q.-y., Zhou, C.-r., & Luo, B.-h. (2006). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical biology*, 44(5), 336-342.
- Derakhshandeh, K., & Fathi, S. (2012). Role of chitosan nanoparticles in the oral absorption of Gemcitabine. *International journal of pharmaceuticals*, 437(1), 172-177.
- Durango, A., Soares, N., Benevides, S., Teixeira, J., Carvalho, M., Wobeto, C., & Andrade, N. (2006). Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan. *Packaging Technology and Science*, 19(1), 55-59.
- Elgadir, M. A., Uddin, M. S., Ferdosh, S., Adam, A., Chowdhury, A. J. K., & Sarker, M. Z. I. (2015). Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of food and drug analysis*, 23(4), 619-629.

- Ellis, A. E. (1990). Lysozyme assays. *Techniques in fish immunology*, 1, 101-103.
- Felt, O., Buri, P., & Gurny, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 24(11), 979-993.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A., & Autrup, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of toxicology*, 85(7), 743-750.
- Grenha, A., Gomes, M. E., Rodrigues, M., Santo, V. E., Mano, J. F., Neves, N. M., & Reis, R. L. (2010). Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92(4), 1265-1272.
- Hashemi, M. M., Aminlari, M., & Moosavinasab, M. (2014). Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme-xanthan gum conjugate. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 594-602.
- Hernández-Téllez, C. N., Plascencia-Jatomea, M., & Cortez-Rocha, M. O. (2016). Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, 315.
- Hernández-Téllez, C. N., Rodríguez-Córdova, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., Torres-Arreola, W., Martínez-Higuera, A., Plascencia-Jatomea, M. (2017). Activity of chitosan-lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1, 3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech*, 7(5), 279.
- Hirano, S., Yamaguchi, R., Fukui, N., & Iwata, M. (1990). A chitosan oxalate gel: its conversion to an N-acetylchitosan gel via a chitosan gel. *Carbohydrate Research*, 201(1), 145-149.
- Hsu, S.-h., Chang, Y.-B., Tsai, C.-L., Fu, K.-Y., Wang, S.-H., & Tseng, H.-J. (2011). Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 198-206.
- Jollès, P., & Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? *Molecular and cellular biochemistry*, 63(2), 165-189.

- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 3-11.
- Kim, S.-K. (2010). *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*: CRC Press.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203.
- Lesnierowski, G., Kijowski, J., & Cegielska-Radziejewska, R. (2009). Ultrafiltration-modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. *International journal of food science & technology*, 44(2), 305-311.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., & Alvarez, P. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water research*, 42(18), 4591-4602.
- Lin, C.-W., Chen, L.-J., Lee, P.-L., Lee, C.-I., Lin, J.-C., & Chiu, J.-J. (2007). The inhibition of TNF- α -induced E-selectin expression in endothelial cells via the JNK/NF- κ B pathways by highly N-acetylated chitooligosaccharides. *Biomaterials*, 28(7), 1355-1366.
- Luque-Alcaraz, A. G., Cortez-Rocha, M. O., Velázquez-Contreras, C. A., Acosta-Silva, A. L., Santacruz-Ortega, H. d. C., Burgos-Hernández, A., Argüelles-Monal, W. M., Plascencia-Jatomea, M. (2016). Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 38.
- Luque-Alcaraz, A. G., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Acosta, A. L., Iloki-Assanga, S. B., Higuera-Ciapara, I., Argüelles-Monal, W. (2012). Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 100.
- Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., & Haza, A. I. (2013). Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. *Acta toxicológica argentina*, 21(2), 102-109.
- Maurer-Jones, M. A., Lin, Y.-S., & Haynes, C. L. (2010). Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS nano*, 4(6), 3363-3373.

- Muzzarelli, R., Biagini, G., Pugnaroni, A., Filippini, O., Baldassarre, V., Castaldini, C., & Rizzoli, C. (1989). Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*, 10(9), 598-603.
- Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., & Varaldo, P. (1990). Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(10), 2019-2023.
- Opanasopit, P., Aumklad, P., Kowapradit, J., Ngawhiranpat, T., Apirakaramwong, A., Rojanarata, T., & Puttipipatkachorn, S. (2007). Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical development and technology*, 12(5), 447-455.
- Pae, J., Säälük, P., Liivamägi, L., Lubenets, D., Arukuusk, P., Langel, Ü., & Pooga, M. (2014). Translocation of cell-penetrating peptides across the plasma membrane is controlled by cholesterol and microenvironment created by membranous proteins. *Journal of Controlled Release*, 192, 103-113.
- Park, J.-M., Kim, M., Park, H.-S., Jang, A., Min, J., & Kim, Y.-H. (2013). Immobilization of lysozyme-CLEA onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications. *International journal of biological macromolecules*, 54, 37-43.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., Byun, H.-G., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. (2004). Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal of microbiology and biotechnology*, 14(2), 317-323.
- Patel, S., Jammalamadaka, U., Sun, L., Tappa, K., & Mills, D. K. (2015). Sustained release of antibacterial agents from doped halloysite nanotubes. *Bioengineering*, 3(1), 1.
- Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Medeiros, B. G. d. S., da Silva, L. H., da Silva, M. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., . Vicente, A. A. (2012). Interactions between κ-carrageenan and chitosan in nanolayered coatings—Structural and transport properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1081-1090.
- Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Quintas, M. A., Coimbra, M. A., & Vicente, A. A. (2012). K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 227-232.

- Piras, A. M., Maisetta, G., Sandreschi, S., Esin, S., Gazzarri, M., Batoni, G., & Chiellini, F. (2014). Preparation, physical–chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. *International journal of biological macromolecules*, 67, 124-131.
- Plascencia-Jatomea, S., Gómez, Y., & Vales-Haro, J. (2014). *Aspergillus* spp.(Black Mold). *Postharvest Decay: Control Strategies*, 267.
- Rogovina, S. Z., Alexanyan, C. V., & Prut, E. V. (2011). Biodegradable blends based on chitin and chitosan: production, structure, and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 121(3), 1850-1859.
- Sudarshan, N., Hoover, D., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257-272.
- Xu, Y., & Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 250(1), 215-226.
- You, S.-J., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E., & Wu, J. (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International*, 43(3), 848-855.