

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 los Alimentos

Respuesta de Estrés de Hongos Fitopatógenos Expuestos a Biocompositos
de Quitosano-Carragenina-Lisozima con Aplicación Potencial en
Productos Hortofrutícolas

TESIS
POR COMPILACIÓN DE PUBLICACIONES

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M. C. Alma Carolina Gálvez Iriqui

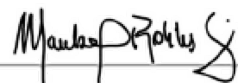
APROBACIÓN

Respuesta de Estrés de Hongos Fitopatógenos Expuestos a Biocompositos de Quitosano-Carragenina-Lisozima con Aplicación Potencial en Productos Hortofrutícolas


M.C. Alma Carolina Gálvez Iriqui
Sustentante


Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Directora de la tesis


Dr. Armando Burgos Hernández
Miembro del comité de tesis


Dra. Rosario Maribel Robles Sánchez
Miembro del comité de tesis


Dra. Silvia Bautista Baños
Miembro del comité de tesis


Dr. Waldo Manuel Argüelles Monal
Miembro del comité de tesis

DERECHOS DE AUTOR

Hermosillo, Sonora a 21 de febrero de 2022.

Asunto: Cesión de derechos

UNIVERSIDAD DE SONORA P R E S E N T E.

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada “Respuesta de Estrés de Hongos Fitopatógenos Expuestos a Biocompositos de Quitosano-Carragenina-Lisozima con Aplicación Potencial en Productos Hortofrutícolas”, en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **DOCTORA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales. La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente. De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

A T E N T A M E N T E



Nombre y Firma del Autor

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Universidad de Sonora por hacer uso de sus instalaciones y por la excelente formación académica durante los 4 años de estudio, así como por el Proyecto Interno USO313006323 otorgado. Además, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México por financiar la investigación (proyecto No. 219786).

DEDICATORIA

*A mis mascotas:
Lennon, Kayla[†], Jake, Angy y Sara.*

CONTENIDO

APROBACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
CONTENIDO.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General	4
Objetivos Particulares	4
JUSTIFICACIÓN.....	5
DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	6
Descripción del artículo 1.....	6
Descripción del artículo 2.....	6
Descripción del artículo 3.....	7
Descripción del artículo 4.....	7
ARTÍCULO 1	8
Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms	8
RESUMEN	10
ARTÍCULO 2	11
Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against <i>Aspergillus niger</i>	11
RESUMEN	13
ARTÍCULO 3	14
Phytotoxicity, cytotoxicity, and <i>in vivo</i> antifungal efficacy of chitosan nanobiocomposites on prokaryotic and eukaryotic cells.....	14
RESUMEN	16
ARTÍCULO 4	17
Synthesis, physical-chemical characterization, and biological activities of chitosan-carrageenan-lysozyme bionanocomposites	17
RESUMEN	18
CONCLUSIONES GENERALES	20
RECOMENDACIONES	22
REFERENCIAS	23

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas recurrentes generados por la contaminación y desarrollo de microorganismos en productos hortofrutícolas es el deterioro de su calidad en postcosecha, provocado especialmente por hongos fitopatógenos. En la actualidad, las pérdidas pre cosecha y postcosecha ocasionadas por plagas en los países en vías de desarrollo oscilan entre el 40 - 50 % y específicamente los hongos son responsables del deterioro de aproximadamente el 20 %; estos porcentajes pueden incrementarse debido a las condiciones climáticas actuales, lo cual representará una seria amenaza para la seguridad alimentaria en pocos años (Flood, 2010; FAO, 2013; Gustavsson *et al.*, 2011; Bebbber, Holmes, & Gurr, 2014). El desarrollo científico ha permitido investigar compuestos de origen biológico para el control de fitopatógenos, los cuales han mostrado ser compatibles con el medio ambiente y además ser eficientes en aplicaciones para el control de plagas y enfermedades en los productos agrícolas y diversos cultivos. Entre ellos destacan los metabolitos secundarios microbianos, enzimas antimicrobianas y biopolímeros como el quitosano. Sin embargo, cada uno de ellos presenta limitantes relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas inherentes, tamaño, toxicidad, estabilidad, tiempo de biodegradación, concentración, entre otras (Martínez-Camacho *et al.*, 2013, Surapuram *et al.*, 2014). Al respecto, el desarrollo de materiales a nano y microescala ha coadyuvado a resolver algunas de estas limitantes, donde se ha observado que al incorporar compuestos bioactivos a matrices poliméricas (biocompositos), se logra un incremento en su actividad biológica, así como una mejora sus propiedades físicas y químicas (Hernández-Téllez *et al.*, 2017). En ensayos *in vitro* se ha demostrado que materiales elaborados a base de una matriz de quitosano y compuestos bioactivos como lisozima, pueden retardar la germinación de esporas fúngicas, provocar un desequilibrio en la producción de enzimas glucanasas relacionadas con la formación de pared celular y alterar el estado oxidativo de hongos resistentes a quitosano como son los del género *Aspergillus spp.* (Chavez-Magdaleno, Gonzalez-Estrada, Ramos-Guerrero, Plascencia-Jatomea, & Gutierrez-Martinez, 2018; Hernández-Téllez *et al.*, 2018, 2017). Si bien estos materiales a base de quitosano destinados para el control de hongos han presentado resultados prometedores, aún es necesario establecer si inducen algún efecto tóxico sobre la salud y al medio ambiente y, asimismo, definir su mecanismo de acción

sobre la inhibición del crecimiento microbiano y de la respuesta microbiana de estrés oxidativo. De este modo, el estudio integral de ensayos *in vitro* e *in vivo* constituye una base que permitirá conocer y establecer la eficiencia y bioseguridad de estos biomateriales al ser utilizados en sistemas biológicos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue sintetizar, caracterizar biológica y fisicoquímicamente biocompositos de quitosano-carragenina-lisozima (CS-CRG-LZ) con potencial aplicación sobre hongos fitopatógenos aislados de productos hortofrutícolas.

HIPÓTESIS

Los biocompositos de quitosano-carragenina-lisozima son capaces de inducir alteraciones en la estructura subcelular y el desarrollo de hongos fitopatógenos aislados, afectando su crecimiento *in vitro*. Asimismo, el material a base de quitosano no induce riesgos toxicológicos en pruebas *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Sintetizar, caracterizar biológica y fisicoquímicamente biocompositos de quitosano-carragenina lisozima con potencial aplicación en la postcosecha de productos hortofrutícolas

Objetivos Particulares

1. Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente biocompositos a base de quitosano-carragenina con lisozima inmovilizada.
2. Determinar la fitotoxicidad *in vitro* de los biocompositos de quitosano-carragenina con lisozima inmovilizada comparado con un control positivo.
3. Aislar, identificar a género y obtener las condiciones óptimas de crecimiento nivel laboratorio de un hongo fitopatógeno contaminante de tomate Saladette (*Solanum lycopersicum* 'Roma').
4. Determinar el efecto del biomaterial sobre el crecimiento radial, estructura subcelular (pared celular, membrana y citoesqueleto) de hongos fitopatógenos.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente la sociedad moderna demanda alimentos variados y de buena calidad, lo cual implica un reto para los agricultores de frutas, hortalizas y granos, ya que deben producir lo suficiente para obtener ganancias y al mismo tiempo, evitar la contaminación del producto requerido por la población. Dentro de los métodos alternativos para el control de plagas y enfermedades se encuentran los nanomateriales de origen biológico como los biocompositos de quitosano-carragenina cargados con lisozima. Se ha demostrado que estos tienen la capacidad de inhibir satisfactoriamente las primeras etapas del crecimiento *in vitro* (germinación de esporas) de hongos resistentes a quitosano, afectando el desarrollo de las principales estructuras de barrera como la pared celular y la membrana plasmática; por ello, la evaluación de su actividad sobre hongos fitopatógenos, constituye una área de oportunidad para el establecimiento de metodologías y estrategias orientadas a la aplicación de estos materiales, su eficacia, los posibles efectos adversos e impacto ambiental en los sistemas biológicos.

DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación está dividido en 4 capítulos, cada uno de ellos representa un artículo publicado, enviado o próximo a enviar para su publicación en alguna revista indizada en el Journal Citation Reports (JCR) del Institute of Scientific Information de la base de datos Thomson- Reuters.

Descripción del artículo 1

En este capítulo se describe el estado del arte sobre la actividad biológica de la lisozima contra bacterias y hongos, centrándose en los mecanismos de acción involucrados. Además, también se discuten los aspectos y características más importantes de las lisozimas y su posible aplicación tecnológica, incluida la aplicación de matrices poliméricas a base de quitosano para la inmovilización de las enzimas antimicrobianas.

Descripción del artículo 2

En este capítulo se evidencia el efecto de biocompositos elaborados a base de quitosano cargados con compuestos bioactivos como ácido pirrol-2-carboxílico, sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*. Se encontró que el material redujo la viabilidad de las esporas del hongo hasta en un 58 %, además de ocasionar alteraciones en la morfometría tales como un aumento en el diámetro promedio de las esporas, hinchazón, distorsión y aumento en la ramificación de las hifas. Asimismo, el análisis de fluorescencia evidenció que el material es capaz de inducir un aumento en el estado de estrés oxidativo, daños en la integridad de la membrana y afectaciones en la pared celular, principalmente en las primeras etapas de crecimiento.

Descripción del artículo 3

En este capítulo se evidencian los resultados más relevantes acerca del efecto fitotóxico, citotóxico y antifúngico biocompuestos de quitosano cargados con ácido pirrol-2-carboxílico (CS-PCA). El ensayo de fitotoxicidad reveló que el material de CS-PCA resultó ser altamente tóxico para las semillas de lechuga, al inhibir completamente el desarrollo de las semillas. Asimismo, el ensayo antifúngico *in vivo* demostró que el material de CS-PCA retrasó la infección por *Aspergillus niger* en frutos de tomate Saladette (*Solanum lycopersicum* ‘Roma’) hasta el día 3; sin embargo, tomando en cuenta los resultados derivados del ensayo de fitotoxicidad, el uso de este material para el pretratamiento de semillas podría tener efectos adversos en el desarrollo de las plantas.

Descripción del artículo 4

En este capítulo se muestran los resultados más relevantes de la evaluación de la actividad biológica de biocompuestos de quitosano-carragenina-lisozima (CS-CRG-k/LZ), incluyendo información sobre la síntesis y la caracterización físico-química de los nanomateriales elaborados. La técnica de complejación iónica permitió obtener un material capaz de retardar el crecimiento radial *in vitro* de cuatro hongos fitopatógenos aislados a partir de productos hortofrutícolas. Se reportan las afectaciones estructurales observadas durante la etapa de crecimiento apical del hongo después de su exposición a las nanopartículas. El ensayo de fitotoxicidad demostró que los biomateriales de CS-CRG-k/LZ afectan el proceso de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), lo que pone en evidencia la alta-moderada toxicidad en los sistemas biológicos.

ARTÍCULO 1

Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms

Lisozimas: características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos

Artículo publicado en: Revista Mexicana de Fitopatología

Mexican Journal of Phytopathology

Open Access Line (OA), publicada por la Sociedad Mexicana de Fitopatología
(Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología, CONACyT)

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-6

Año: 2020

Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms

Lisozimas: características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos

Alma Carolina Gálvez-Irqui, Maribel Plascencia-Jatomea*, Laboratory of Microbiology and Mycotoxins, Department of Food Research and Postgraduate, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales S/N, Colonia Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México; Silvia Bautista-Baños, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, CEPROBI 8, C.P. 62731, San Isidro Yautepec, Morelos, México. *Autor para correspondencia: maribel.plascencia@unison.mx

Recibido: 22 de Mayo, 2020.

Aceptado: 29 de Julio, 2020.

Gálvez-Irqui AC, Plascencia-Jatomea M and Bautista-Baños S. 2020. Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. Mexican Journal of Phytopathology 38(3).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-6

Primera publicación DOI: 11 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 11, 2020.

Abstract. Since lysozymes and enzymes-like lysozymes have antibacterial and antifungal activity, they are becoming attractive as new alternatives for controlling pathogenic microorganisms. Although the antimicrobial enzymes have been proposed in the food industry and crop protection, their use involves some disadvantages. These include the inactivation by inhibitors, chemicals, or processing conditions, the high production and purification costs, and problems of solubility and

Resumen. Dentro de las enzimas antimicrobianas reportadas, las lisozimas y las enzimas tipo lisozimas procedentes de diversas fuentes naturales han mostrado actividad antibacteriana y antifúngica, haciéndolas atractivas como nuevas alternativas para controlar los microorganismos patógenos. Aunque las enzimas antimicrobianas se han propuesto ampliamente en la industria alimentaria y en la protección de cultivos, su uso implica algunas desventajas, como la inactivación por inhibidores o productos químicos o condiciones de procesamiento, los altos costos de producción y purificación, y problemas de solubilidad e inestabilidad. La tecnología de inmovilización enzimática es una herramienta prometedora capaz de reducir estos inconvenientes, particularmente cuando está destinada a trabajar en medios sólidos. Esta revisión muestra el estado del arte sobre la actividad de la lisozima contra bacterias y hongos, centrándose en los mecanismos de acción involucrados. Además, también se discuten los aspectos y características más

RESUMEN

Las enzimas antimicrobianas como las lisozimas y enzimas tipo lisozimas ha demostrado tener no solo actividad antibacteriana, si no también antifúngica, haciéndolas atractivas como nuevas alternativas para controlar los microorganismos patógenos. Si bien las enzimas antimicrobianas han sido propuestas para su uso en la industria alimentaria y en la protección de cultivos, esto implica algunas desventajas, como la inactivación por inhibidores o productos químicos o condiciones de procesamiento, los altos costos de producción y purificación y problemas de solubilidad e inestabilidad. La tecnología de inmovilización enzimática es una herramienta promisorio capaz de reducir estos inconvenientes, específicamente cuando se quiere trabajar en medios sólidos. Esta revisión evidencia el estado del arte sobre la actividad de la lisozima contra bacterias y hongos, centrándose en los mecanismos de acción involucrados. Asimismo, se analizan los aspectos y características más relevantes de las lisozimas, como su posible aplicación tecnológica, incluida la utilización de matrices poliméricas a base de quitosano para la inmovilización de las enzimas con actividad antimicrobiana.

ARTÍCULO 2

Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*

Artículo publicado en: *Applied Microbiology and Biotechnology*
(Editorial Springer Nature Switzerland AG., Factor de impacto: 4.813)

<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09670-w>

Año: 2019



Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*

Alma Carolina Gálvez-Irqui¹ · Mario Onofre Cortez-Rocha¹ · Armando Burgos-Hernández¹ · Montserrat Calderón-Santoyo² · Waldo Manuel Argüelles-Monal³ · Maribel Plascencia-Jatomea¹

Received: 31 July 2018 / Revised: 27 January 2019 / Accepted: 29 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

A wide variety of chitosan (CS) biomaterials have been loaded with different antimicrobial agents to improve the activity of CS against phytopathogenic fungi. Recently, the antimicrobial activity of 1H-pyrrole-2-carboxylic acid (PCA) has been reported as a secondary metabolite of *Streptomyces griseus*, which was identified as the main bioactive compound in the biological control. However, it is sensitive to light and its activity against filamentous fungi has not yet been reported. The aim of the present research work was to evaluate the biological activity of CS-PCA biocomposites for the control of *Aspergillus niger*. CS-PCA biocomposites were obtained through nanoprecipitation. In vitro antifungal activity was determined by viability assay, spore germination, morphometric analysis of spores and hyphae, and the analysis of cellular components by fluorescence microscopy. CS-PCA showed an average size and Z potential of 502 ± 72 nm and $+54.7 \pm 15$ mV, respectively. Micrographs demonstrated well-distributed biocomposites with an apparently spherical shape. A new signal at 1473 cm^{-1} in the FT-IR spectrum of the CS-PCA biocomposite was observed, confirming the presence of PCA in the composition of the CS-PCA nanosystem. CS-PCA biocomposites reduced the spores' viability by up to 58%. Effects on fungi morphometry, observed as an increase in the spores' average diameter, swelling, distortion, and an increase in the branching of hyphae, were observed. Fluorescence analysis showed oxidative stress and membrane and cell wall damage, mainly at early growth stages. The inhibitory effect against CS-resistant fungi, such as *A. niger*, opens a door for the control of CS-sensitive fungi.

Keywords Antifungal · *Aspergillus niger* · Chitosan biocomposites · Secondary metabolite · Nanoprecipitation

Introduction

Biotechnology has made its way into the design of micro- and nanostructured systems with promising agricultural applications in the control of pests and diseases. Its formulation has

attempted to use natural and bioactive compounds with a low environmental impact and low toxicity. Among these natural compounds, essential oils, and metabolites of microbial origin, such as antibiotics, defense enzymes, and organic acids, among other substances produced mainly by antagonistic microorganisms, have been successfully tested (Cota-Arriola et al. 2011; Luque-Alcaraz et al. 2016a; Hernández-Téllez et al. 2017). The activity of antagonistic microorganisms against fungal pathogens is commonly related to the production of antifungal metabolites, which have direct or indirect potential for the biological control of phytopathogenic fungi. Recently, an active metabolite from *Streptomyces griseus* H7602, with a strong in vitro antagonistic effect on the oomycete *Phytophthora capsici*, was isolated and identified as 1H-pyrrole-2-carboxylic acid (PCA), which inhibited the growth of *P. capsici* at a concentration of 64 mg/mL (Nguyen et al. 2015). In a similar study, partially purified proteins (catalase, protease, and chitin binding protein) from *Pseudomonas*

✉ Maribel Plascencia-Jatomea
maribel.plascencia@unison.mx

¹ Microbiology and Micotoxins Laboratory, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

² Integral Laboratory of Food Research, Instituto Tecnológico de Tepic, Avenida Tecnológico 2595, Lagos del Country, Tepic 63175, Nayarit, Mexico

³ Biopolymer Laboratory, Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentación, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, N0. 46, Hermosillo 83304, Sonora, Mexico

RESUMEN

Una amplia variedad de biomateriales de quitosano (CS) se han cargado con diferentes agentes antimicrobianos para mejorar la actividad de CS contra hongos fitopatógenos. Recientemente, se ha reportado la actividad antimicrobiana del ácido 1H-pirrol-2-carboxílico (PCA) como metabolito secundario de *Streptomyces griseus*, el cual fue identificado como el principal compuesto bioactivo en el control biológico. Sin embargo, es sensible a la luz y aún no se ha informado su actividad contra hongos filamentosos. El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la actividad biológica de biocompuestos CS-PCA para el control de *Aspergillus niger*. Los biocompuestos CS-PCA se obtuvieron mediante nanoprecipitación. La actividad antifúngica *in vitro* se determinó mediante ensayo de viabilidad, germinación de esporas, análisis morfométrico de esporas e hifas y análisis de componentes celulares mediante microscopía de fluorescencia. El análisis de dispersión dinámica de la luz de los biocompositos de CS-PCA evidenció un tamaño promedio y un potencial Z de 502 ± 72 nm y $+54,7 \pm 15$ mV, respectivamente. Las micrografías de microscopía electrónica de barrido ambiental (MEB-A) evidenciaron partículas bien distribuidas con una forma aparentemente esférica. Se observó una nueva señal a 1473 cm^{-1} en el espectro FT-IR de los biocompuestos CS-PCA, lo que confirma la presencia de PCA en la composición del nanosistema CS-PCA. Los biocompuestos CS-PCA redujeron la viabilidad de esporas de *A. niger* hasta en un 58 %. Asimismo, se observaron efectos sobre la morfometría como un aumento en el diámetro promedio de las esporas, hinchazón, distorsión y aumento en la ramificación de las hifas. El análisis de fluorescencia evidencio un aumento en el estado general de estrés oxidativo, daño en la membrana y la pared celular, esto principalmente en las primeras etapas de crecimiento. El efecto inhibitorio encontrado sobre *A. niger*, al ser un hongo resistentes a CS, abre una puerta para el control de hongos sensibles a CS.

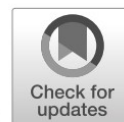
ARTÍCULO 3

Phytotoxicity, cytotoxicity, and *in vivo* antifungal efficacy of chitosan nanobiocomposites on prokaryotic and eukaryotic cells

Artículo Publicado en: *Environmental Science and Pollution Research*
(Editorial Springer Nature Switzerland AG.; Factor de impacto 4.223)

<https://doi.org/10.1007/s11356-020-10716-0>

Año: 2020



Phytotoxicity, cytotoxicity, and in vivo antifungal efficacy of chitosan nanobiocomposites on prokaryotic and eukaryotic cells

Alma Carolina Gálvez-Irqui¹ · Joel Said García-Romo¹ · Mario Onofre Cortez-Rocha¹ · Armando Burgos-Hernández¹ · María Guadalupe Burboa-Zazueta² · Ana Guadalupe Luque-Alcaraz³ · Montserrat Calderón-Santoyo⁴ · Waldo Manuel Argüelles-Monal⁵ · Maribel Plascencia-Jatomea¹

Received: 26 May 2020 / Accepted: 30 August 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Chitosan (CS) nanosystems have potential applications for the control of microorganisms in the medical, environmental, and agrifood fields. In vivo and in vitro assays of CS nanosystems have experienced increased activity due to improved physico-chemical properties, biological activity, and reactivity. Hence, it is important to determine whether their application involves toxicological risks. The aim of this study was to evaluate the mutagenic, cytotoxic, phytotoxic, and in vivo antifungal activity of chitosan-pyrrole-2-carboxylic acid nanobiocomposites (CS-PCA). The CS-PCA nanoparticles were synthesized by means of the nanoprecipitation technique with a size and ζ -potential of 502 ± 72 nm and $+ 54.7 \pm 15.0$ mV, respectively. According to the Ames test, no evidence of mutagenic activity was observed in *Salmonella typhimurium* strains. The cytotoxic assay showed that the incorporation of PCA into the CS matrix increased the toxic effect on ARPE-19 cells. However, fluorescence microscopy of ARPE-19 cells did not reveal morphostructural changes allusive to cell injury. CS-PCA exhibited strong phytotoxicity on lettuce seeds and the complete inhibition of seed development. The antifungal assay demonstrated that the CS-PCA delayed *Aspergillus niger* infection in tomato fruit until day 3; however, its use for the pre-treatment of seeds might exert adverse effects on plant development.

Keywords Toxicity · Antifungal activity · Biocomposites · Antimicrobial biopolymers · Food chain

Introduction

Chitosan (CS), a partially deacetylated form of the chitin, has become its main derivative. Chitin constitutes one of the most abundant biomaterials together cellulose (Roberts, 2006), and it is estimated that over 100 gigatons of chitin are produced in the biosphere per year (Whistler, 1993). Chemically, CS is a family of polymers whose backbone is formed by a linear structure of β -(1,4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose and 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose residues, which are randomly distributed. Depending on the extraction method, CS can comprise an homogeneous or heterogeneous mixture of polymers of different molecular weight and degree of deacetylation. Structurally, CS has a $-\text{NH}_2$ group at the C2 position of the glucose monomer, which allows it to be soluble in weak acid solutions due to protonation. Thus, the polycationic nature of the biopolymer at $\text{pH} < 6.5$ is associated with important properties, such as mucoadhesiveness, biocompatibility, chelant capacity, antioxidant and antimicrobial activity, and potential plant-based preservative properties,

Responsible Editor: Philippe Garrigues

✉ Maribel Plascencia-Jatomea
maribel.plascencia@unison.mx

¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Microbiology and Mycotoxins Laboratory, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, México

² Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Cell Biology Laboratory, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, México

³ Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad Estatal de Sonora, Ley Federal del Trabajo S/N, Col. Apolo, 83100 Hermosillo, Sonora, México

⁴ Integral Laboratory of Food Research, Instituto Tecnológico de Tepic, Avenida Tecnológico 2595, Col. Lagos del Country, 63175 Tepic, Nayarit, México

⁵ Biopolymer Laboratory, Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentación, A.C., Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, N.O. 46, 83304 Hermosillo, Sonora, Mexico

RESUMEN

Los nanosistemas de quitosano (CS) se han propuesto en aplicaciones para el control de microorganismos en el campo médico, ambiental y agroalimentario. Mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, se ha evidenciado que los nanosistemas CS aumentan la actividad biológica debido a las propiedades fisicoquímicas y la reactividad mejorada. Derivado de lo anterior, es importante determinar si la utilización de estos materiales implica riesgos toxicológicos para el humano y el medio ambiente. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad mutagénica, citotóxica, fitotóxica y antifúngica *in vivo* de los biocompuestos de ácido quitosano-pirrol-2-carboxílico (CS-PCA). Los biocompuestos de CS-PCA fueron sintetizados mediante la técnica de nanoprecipitación con un tamaño y potencial Z de 502 ± 72 nm y $+ 54,7 \pm 15,0$ mV, respectivamente. Según la prueba de Ames, no se observó evidencia de actividad mutagénica en las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. El ensayo citotóxico mostró que la incorporación de PCA en la matriz CS aumentó el efecto tóxico sobre las células ARPE-19. Sin embargo, la microscopía de fluorescencia de las células ARPE-19 no reveló cambios morfoestructurales alusivos a la lesión celular. Sin embargo, el material (CS-PCA) indujo un efecto inhibitorio y altamente tóxico sobre el desarrollo de semillas de lechuga, esto según los índices normalizados de germinación (IG) y de elongación de la radícula (REI). El ensayo antifúngico demostró que el material (CS-PCA) retrasó la infección por *Aspergillus niger* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* 'Roma') hasta el día 3; sin embargo, su uso para el pretratamiento de semillas podría tener efectos adversos en el desarrollo de las plantas.

ARTÍCULO 4

Synthesis, physical-chemical characterization, and biological activities of chitosan-carrageenan-lysozyme bionanocomposites

Alma Carolina Gálvez-Iriqui¹, Aaron de Jesús Rosas-Durazo⁴, Waldo Manuel Argüelles-Monal³, Rosario Maribel Robles Sánchez¹, Armando Burgos-Hernández¹, Silvia Bautista-Baños², Maribel Plascencia-Jatomea^{1*}

En proceso para su envío a *Polymers*

Editorial MDPI (Basel, Switzerland); Factor de impacto 4.329

RESUMEN

A partir de estudios donde se ha realizado la inmovilización de enzimas antimicrobianas como la lisozima en matrices poliméricas, se ha observado un aumento en la actividad antibacteriana y efectividad (Gálvez-Irqui, Plascencia-Jatomea and Bautista-Baños, 2020). El quitosano y la carragenina son matrices poliméricas que se han utilizado para este fin. En este capítulo se muestran los resultados más relevantes de la evaluación de la actividad biológica de biocompuestos de quitosano-carragenina-lisozima (CS-CRG-k/LZ). A partir de la caracterización parcial de las materias primas se obtuvo un peso molecular viscosimétrico (Mv) de 105.8 kDa y porcentaje de grado de desacetilación de 67.6 ± 2.9 %, los cuales son valores bajos para un quitosano reportado como de medio peso molecular. Respecto a la caracterización de lisozima, se evidenció que esta presenta actividad en un amplio rango de pH desde 3 a 7, sin embargo, el mayor porcentaje de actividad enzimática relativa se encuentra entre 5.5 a 6.5 (pH óptimo). Asimismo, la actividad enzimática se mantuvo estable por encima del 85 % a pH 6 y 7 por 120 horas. La κ -carragenina utilizada en el estudio, según el proveedor, tiene las siguientes especificaciones: contenido de grupos sulfatos (28 %), metales pesados (0.002 %), cenizas (2 ppm) e insolubles en ácido (0.6 %). El material CS- κ -CRG-Lz fue sintetizado utilizando la técnica de complejación iónica, la cual permitió obtener un material de $332.94 \text{ nm} \pm 5.6 \text{ nm}$ de diámetro hidrodinámico, $+ 26 \text{ mV} \pm 1.1 \text{ mV}$ de potencial Z y 0.243 ± 0.0 de índice de polidispersión. El material de CS- κ -CRG-Lz presentó un porcentaje de eficiencia de encapsulación de 63.14 ± 1.24 % y un porcentaje de capacidad de carga de 28.54 ± 4 %. El análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) realizado en la muestra sólida, indicó la presencia de partículas aglomeradas debido al proceso de liofilización. Sin embargo, las micrografías por microscopía electrónica de barrido ambiental (MEB-A), obtenidas en muestras líquidas, sugieren que las partículas son esféricas y ovaladas con una distribución de tamaños mayormente homogénea. El ensayo de fitotoxicidad con semillas de lechuga demostró que los biomateriales de CS- κ -CRG-Lz a partir de $268 \text{ } \mu\text{g/ml}$ inhiben en un 93 % la germinación de la semilla y, por tanto, la elongación de las radículas y del hipocótilo. Los índices normalizados de la elongación de las radículas (REI) y el índice de germinación (NGI) evidenciaron que los materiales inducen una toxicidad de alta a moderada, lo que pone en evidencia que estos no son

materiales aptos para dar tratamiento a la semilla. Para la evaluación antifúngica del material CS-κ-CRG-Lz, se realizó un aislamiento y la identificación de un cultivo puro de un hongo fitopatógeno procedente de tomates contaminados, esto indicó a partir de la evaluación de sus características macroscópicas, microscópicas y un análisis molecular que se trataba de *Fusarium verticillioides*; sin embargo, al ser este un hongo saprófito y no considerarse un fitopatógeno propio de los cultivos de tomate, se siguió la recomendación de evaluar los nanomateriales de CS-κ-CRG-Lz con otras cepas fitopatógenas de interés. La evaluación de la actividad antifúngica de la lisozima pura sobre *F. verticillioides* indicó que esta es capaz de provocar un efecto fungistático sobre el crecimiento macroscópico (crecimiento radial) y microscópico (germinación de esporas) de *F. verticillioides*. El efecto de la lisozima a nivel estructural, a partir de tinciones de fluorescencia, indicó que esta es capaz de alterar el desarrollo de hifas durante el proceso de germinación. Este comportamiento es de interés, ya que evidencia que la lisozima puede tener propiedades antifúngicas y es posible que al inmovilizarla en un nanomaterial a base de quitosano y carragenina aumente su actividad. Derivado de la evaluación del efecto antifúngico de los nanomateriales de CS-κ-CRG-Lz, los resultados del ensayo colorimétrico de viabilidad de esporas de *F. verticillioides*, indicaron que esta cepa es altamente sensible al material, ya que fue inhibida completamente (100 % de inhibición) a todas las concentraciones evaluadas (50 µg/mL a 1 mg/mL). Asimismo, se evaluó el efecto del nanomaterial sobre el crecimiento radial de cuatro cepas fitopatógenas para productos hortofrutícolas *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata* y *Penicillium crostosum* aisladas e identificadas previamente en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN). En el caso particular de *A. alternata*, esta experimentó una inhibición de su crecimiento radial en un 100 % cuando fue expuesta a 350 µg/ml del nanomaterial de CS-κ-CRG-Lz, seguido de *P. crostosum* con un 14.6 % de inhibición, *R. stolonifer* con un 14 % de inhibición y *A. flavus* con un 7 % de inhibición del crecimiento radial. Los parámetros cinéticos estimados con el modelo de Gompertz para el crecimiento máximo confirmaron la sensibilidad de *A. alternata* con la velocidad de crecimiento, la fase *lag* y el crecimiento máximo. La exploración a campo claro de las estructuras del micelio formado de *R. stolonifer* evidenció afectaciones en el desarrollo de las hifas durante la etapa de crecimiento apical después de la exposición a los nanomateriales de CS-κ-CRG-Lz.

CONCLUSIONES GENERALES

- El método de complejación iónica permitió sintetizar biocompositos de CS-k-CRG-Lz con tamaño promedio de 332.94 ± 5.6 nm. Las modificaciones post síntesis como la eliminación del proceso de ultrasonicación y la purificación a través de membrana permitió obtener un material con mayor estabilidad. El análisis de FT-IR sugirió que existen interacciones débiles como puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre los componentes del nanomaterial a base del quitosano permitiendo su formación.
- El análisis fitotóxico sobre la germinación de semillas de lechuga fue útil para determinar que tanto los biocompositos de CS-CRG-k cargados con lisozima y sin carga pueden inducir efectos indeseables durante la germinación de la semilla y la elongación de sus raíces; según los índices normalizados de elongación de las radículas e índice de germinación de las semillas, los biosistemas son altamente tóxicos o muy tóxicos sobre el desarrollo de las radículas, moderadamente tóxicos sobre la germinación de la semilla, a bajas concentraciones. Capaces de alterar la fisiología y morfología de las plántulas en crecimiento. Es de importancia mencionar que son necesarios ensayos de toxicidad del material sobre otros modelos de estudios como es el caso de líneas celulares humanas.
- La evaluación de las características macroscópicas, microscópicas y un análisis molecular de un cultivo fúngico puro permitió identificar a *Fusarium verticillioides* como parte de tejidos en descomposición de tomates Saladette. Sin embargo, al ser este un hongo saprófito y no considerarse un fitopatógeno propio de los cultivos de tomate, fue importante evaluar los biosistemas utilizando otras cepas fitopatógenas de interés.
- La lisozima fue capaz de provocar un efecto fungistático sobre el crecimiento macroscópico (crecimiento radial) y microscópico (germinación de esporas) de *F. verticillioides*. Asimismo, la lisozima es capaz de alterar el desarrollo de hifas durante el proceso de germinación. Este comportamiento fue de interés para las evaluaciones

antifúngicas al combinar la enzima en un nanomaterial a base de quitosano y carragenina.

- Los biosistemas de CS- κ -CRG-Lz fueron eficaces inhibiendo completamente la viabilidad de esporas de *F. verticillioides* a todas las concentraciones probadas en este estudio.
- Asimismo, los biosistemas de CS- κ -CRG-Lz fueron útiles para retardar la velocidad y en el crecimiento máximo durante la etapa de crecimiento micelial de *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium crostosum* y *Alternaria alternata*, siendo esta última cepa la más sensible a todas las concentraciones probadas.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la toxicidad de los biosistemas de CS-CRG-k y CS-CRG-k/LZ en modelos *in vivo* similares al organismo humano para descartar efectos nocivos al proponerse como parte de recubrimientos comestibles.
- Se recomienda analizar el efecto de los biosistemas de CS-CRG-k y CS-CRG-k/LZ sobre la estructura celular de los hongos fitopatógenos evaluados en esta investigación, examinando a campo claro el desarrollo micelial y utilizando marcadores de fluorescencia.
- Se recomienda escalar la evaluación antifúngica a modelos *in vivo* en campo que permitan establecer una aplicación para el control de enfermedades fúngicas postcosecha, como su utilización en recubrimientos o empaques inteligentes.

REFERENCIAS

- Bebber, D. P., Holmes, T., & Gurr, S. J. (2014). The global spread of crop pests and pathogens. *Global Ecology and Biogeography*, 23(12), 1398–1407. <https://doi.org/10.1111/geb.12214>
- Chavez-Magdaleno, M. E., Gonzalez-Estrada, R. R., Ramos-Guerrero, A., Plascencia-Jatomea, M., & Gutierrez-Martinez, P. (2018). Effect of pepper tree (*Schinus molle*) essential oil-loaded chitosan bio-nanocomposites on postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* and quality evaluations in avocado (*Persea americana*) cv. Hass. *Food Science and Biotechnology*, 27(6), 1871–1875. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0410-5>
- FAO. (2013). El cambio climático, las plagas y las enfermedades transfronterizas Boletín Informativo. Roma, Italia.
- Flood, J. (2010). The importance of plant health to food security. *Food Security*, 2, 215–231.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). Global food losses and food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Hernández-Téllez, C. N., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Rosas-Burgos, E. C., 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 Ingeniería Química*, 17(3), 897–912. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Hernandez>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0913-4>
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., Burgos-Hernández, A., ... Plascencia-Jatomea, M. (2013). Extruded films of blended chitosan, low density polyethylene and ethylene acrylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 666–674. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.08.076>
- Surapuram, V., Setzer, W. N., McFeeters, R. L., & McFeeters, H. (2014). Antifungal activity of

plant extracts against *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. Natural product communications, 9(11), 1603-1605.