



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/uam/izt/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; Prabaharan, 2015).

La bioactividad del quitosano se atribuye principalmente a los grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) 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 ($\text{pI} \approx 11$) 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 (ι) 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-Magdaleno 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 $\Theta = 163.5^\circ$ (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 bicinchonico 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-Crg 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 μL 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 $\mu\text{g/mL}$, 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 $\mu\text{L}/99 \mu\text{L}$ 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 μmol) (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

10⁶ 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) (Meletiadis 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 μm (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 μL 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 μL 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 $\mu\text{g/mL}$. 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 μL 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 adicionales 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% (CI₅₀) 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*.

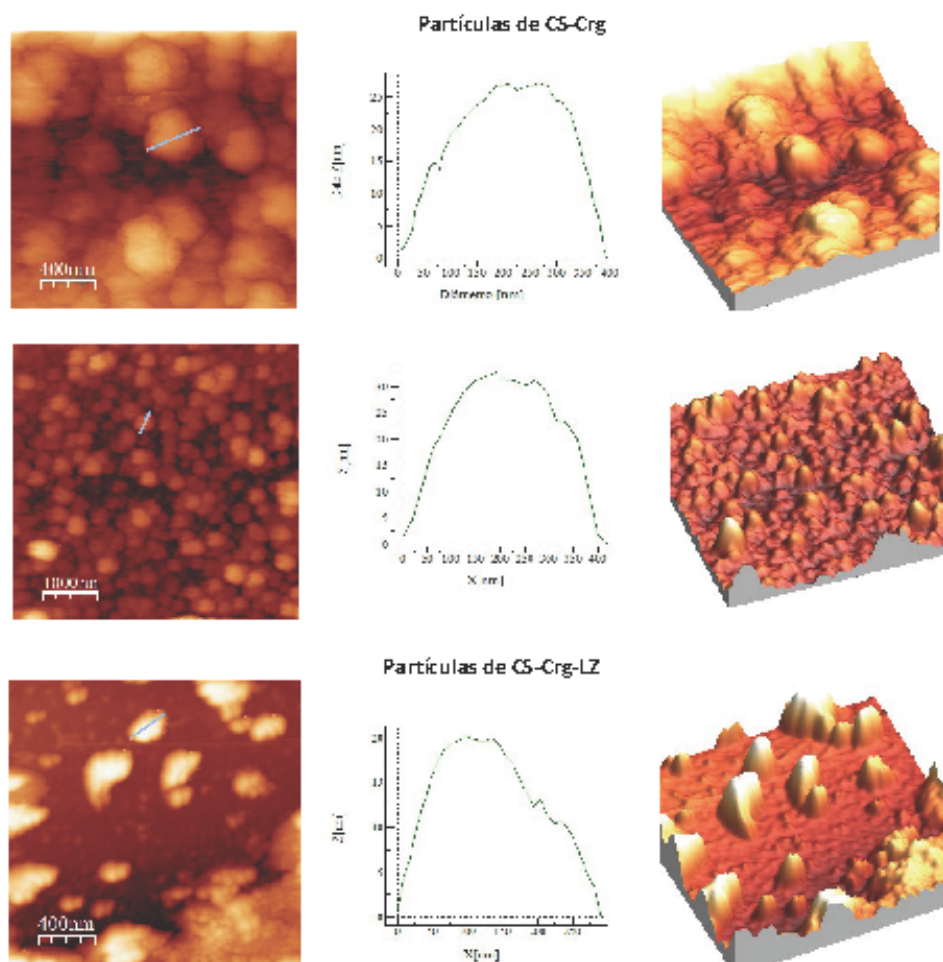


Fig. 1. Imágenes de las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ obtenidas por microscopía de fuerza atómica, AFM.

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 dónde 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

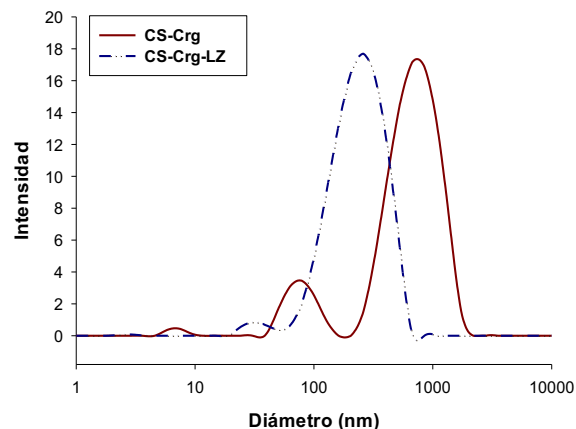


Fig. 2. Distribución de tamaños de las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ, obtenidos mediante análisis de DLS.

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

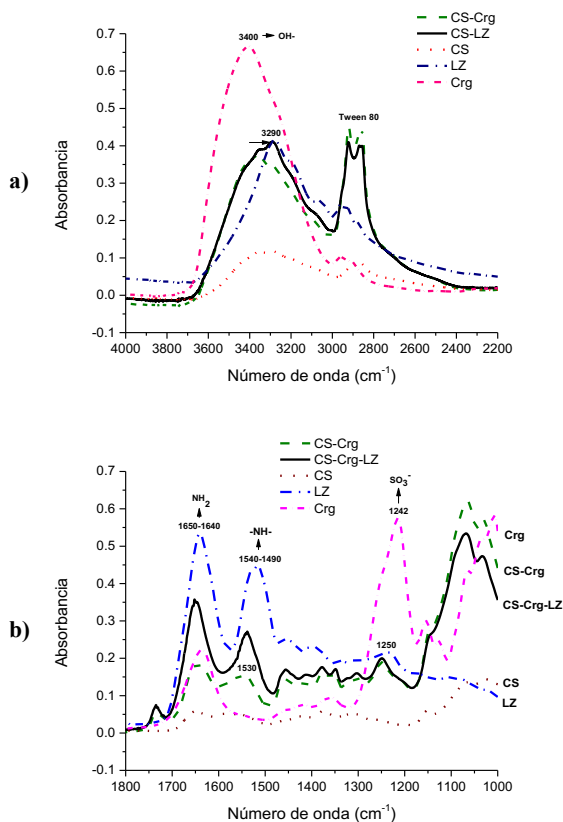


Fig. 3. Análisis de FT-IR de las partículas de CS-Crg y de CS-Crg-LZ.

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 1650-1640 y 1540-1490 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

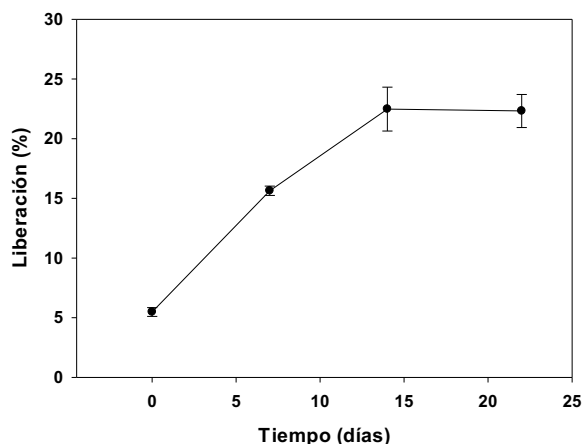


Fig. 4. Perfil de liberación *in vitro* de la lisozima de las partículas de CS-Crg-LZ en buffer acetato de sodio (pH=6.0).

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 $\mu\text{g/mL}$). 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).

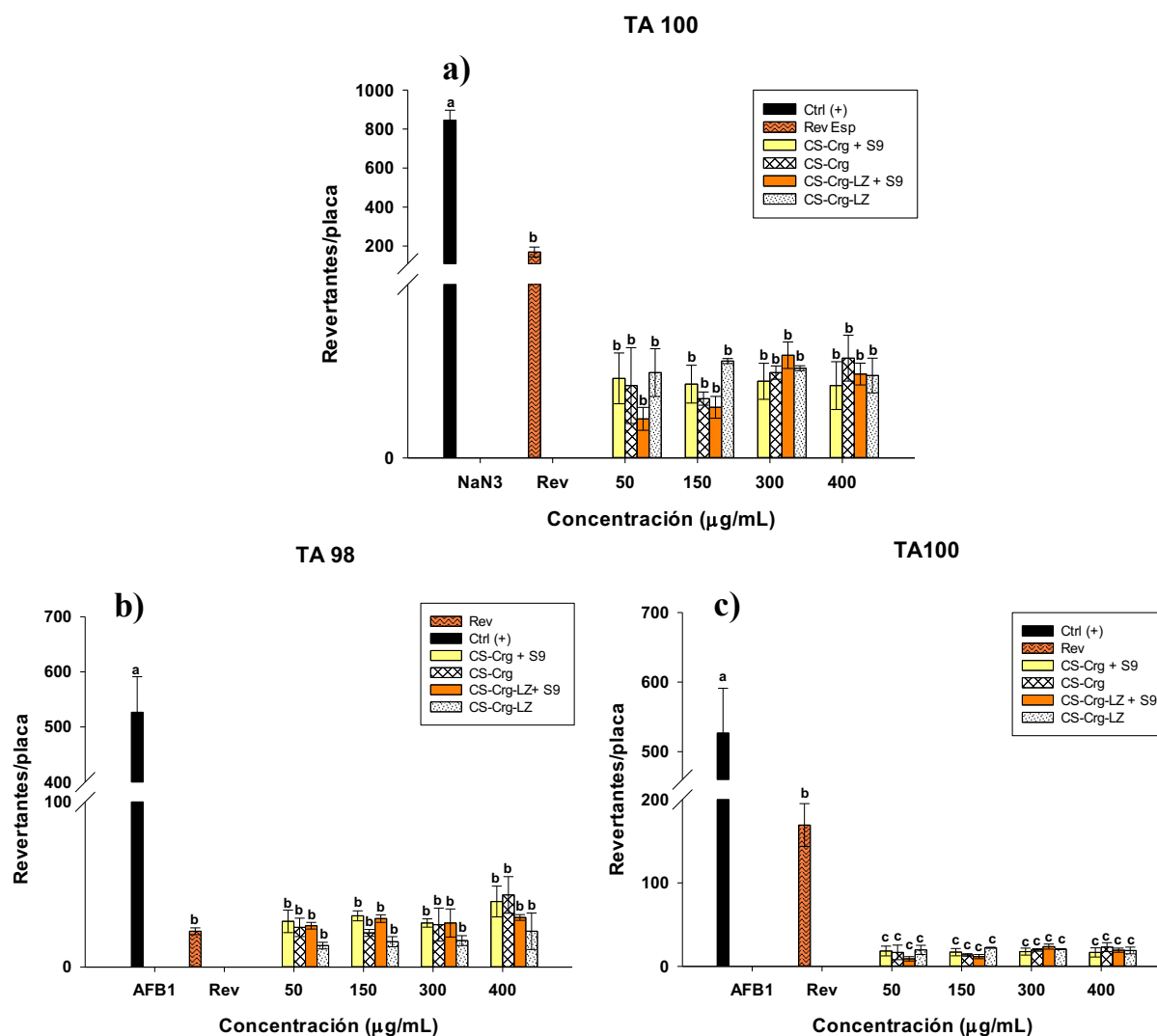


Fig. 5. Número total de colonias revertantes por placa de las partículas de CS y de CS-Crg-LZ para las cepas TA98 y TA100. El control positivo fue AFB1 para TA98 y NaN_3 para la TA100. Los resultados son promedio de triplicados. Letra distinta en barras indica diferencia significativa por tratamiento.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

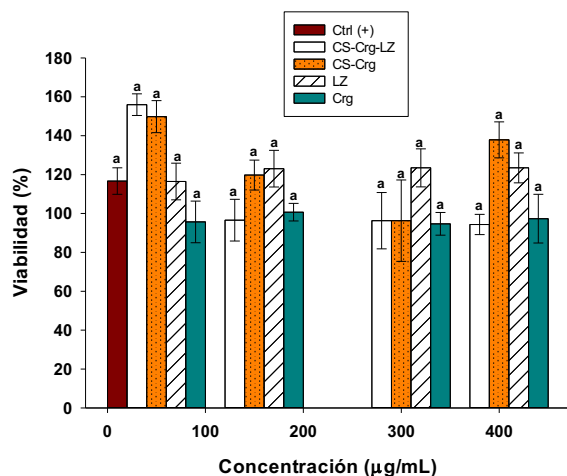


Fig. 6. Efecto de las partículas de CS-Crg, CS-Crg-LZ y soluciones de LZ y Crg en la viabilidad de células ARPE-19 en medio DMEM.

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-Crg (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 biocompositos 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 IC₅₀ (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 Fe₃O₄ 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 Fe²⁺ 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).

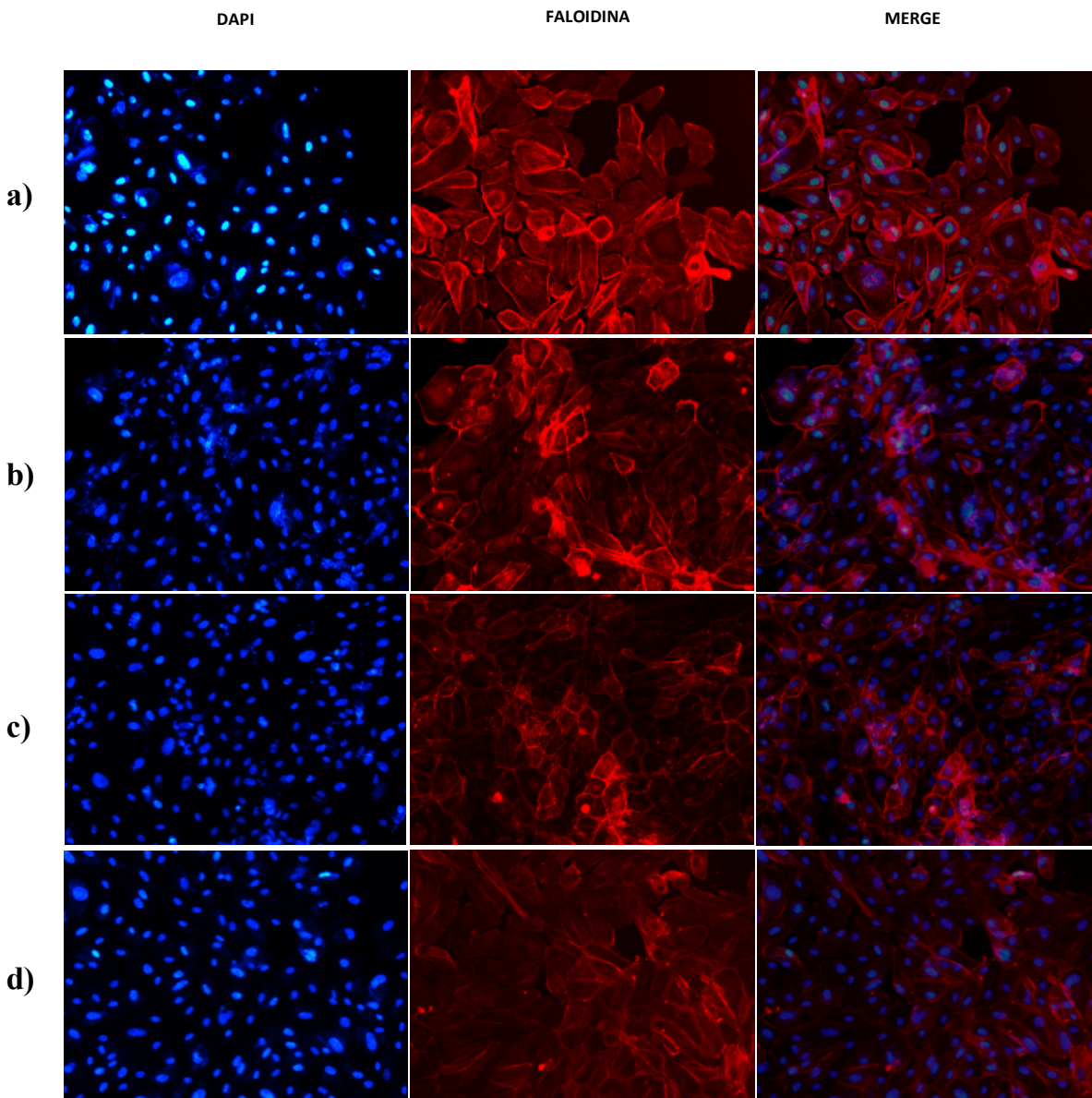


Fig. 7. Efecto de las partículas de Cs-Crg, CS-Crg-LZ y lisozima en cambios morfológicos de células ARPE en medio DMEM, a las 48 h. Visualización del citoesqueleto de actina de la membrana teñido con faloidina (rojo), ADN teñido con DAPI (azul), merge (traslapamiento de ambas imágenes). Control agua.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

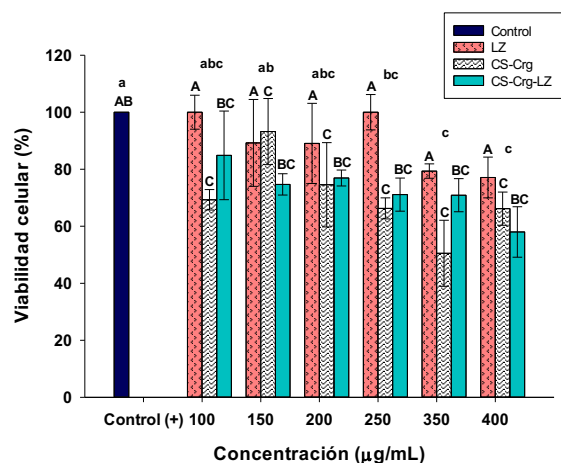


Fig. 8. Efecto de la viabilidad celular sobre esporas de *Aspergillus parasiticus* de la solución de lisozima y las partículas de CS-Crg y CS-Crg-LZ. Letras distintas en mayúscula indican diferencia significativa por tratamientos, letras distintas en minúscula indican diferencia significativa por concentración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

Algunas especies de *Aspergillus* tales como *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. ustus* (Meletiadis 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-Korzycka 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 coadyuve 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., Ezquerro-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., Ezquerro-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.
- Meletiadiis, 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.
- Rodrigues, 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.