

# CAPÍTULO 1

## ÁREA DE ALIMENTOS

### APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA CONSERVACIÓN DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS, COMO LÍNEA DE INVESTIGACIÓN EN EL CEPROBI-IPN

---

**Zormy Correa-Pacheco<sup>1</sup>, Laura Leticia Barrera-Necha<sup>2</sup>,  
Rosa Isela Ventura-Aguilar<sup>1</sup>, Mónica Hernández-López<sup>2</sup>,  
María Luisa Corona-Rangel<sup>2</sup>, Silvia Bautista-Baños<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>CONACYT-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos. CP 62731, México.

<sup>2</sup>Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos. CP 62731, México.

\*sbautis@ipn.mx

Correa Pacheco, Z. N., Barrera-Necha, L. L., Ventura-Aguilar, R. I., Hernández-López, M., Corona-Rangel, M. L., Bautista-Baños, S. (2021). Aplicación de la nanotecnología en la conservación de productos agrícolas, como línea de investigación en el CEPROBI-IPN. En E. San Martín-Martínez (Ed.), *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen III* (pp. 145-170). Barcelona, España: Omni-science.

## Resumen

La nanotecnología es una ciencia emergente que tiene numerosas aplicaciones en diferentes campos como la medicina, medioambiente y alimentos. En este último rubro, en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN (CEPROBI-IPN), especialmente en el laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas, se ha incluido dentro de sus líneas de investigación, la síntesis, caracterización y aplicación de recubrimientos nanoestructurados con el objetivo principal de conservar productos agrícolas de interés comercial que son susceptibles al daño por microorganismos causantes de importantes pérdidas económicas durante su almacenamiento. Los recubrimientos nanoestructurados formulados se basan en polímeros biodegradables como el quitosano, incorporando también aceites esenciales y extractos vegetales. Los resultados demostraron la eficacia de estos para inhibir a los microorganismos en comparación con las frutas o vegetales no tratadas. Igualmente, su aplicación demostró que no hubo efecto negativo en la maduración de los mismos. A nivel toxicológico, tampoco se observaron daños a nivel genético (genotoxicidad) y citotóxico. En un futuro, es necesario escalar el proceso a nivel comercial, así como, realizar estudios sobre los mecanismos de acción sobre los microorganismos.

**Palabras clave:** Cubiertas nanoestructuradas, quitosano, aceites esenciales, extractos vegetales, microorganismos postcosecha.

## 1. Introducción

Actualmente, la aplicación de la nanotecnología se enfoca en la conservación de productos agrícolas mediante el diseño y desarrollo de nuevos materiales que ayuden a extender la vida de anaquel de estos [1]. La pérdida de alimentos implica serios efectos económicos, ambientales y sociales, ya que, la tercera parte de los productos agrícolas se pierden durante la cadena productiva. Debido a esto, se deben aplicar nuevas tecnologías que cumplan con la corriente actual de nula contaminación al medioambiente y seguridad para el ser humano [2]. Las causas de las pérdidas postcosecha se atribuyen principalmente al inadecuado manejo postcosecha y a la incidencia de plagas y enfermedades. La presencia de microorganismos patógenos que incluyen bacterias y hongos, causan el deterioro grave de las frutas y hortalizas [3, 4].

Entre las soluciones que se han buscado para inhibir el desarrollo de estos microorganismos patógenos, se encuentra el uso de películas y recubrimientos comestibles [5-7]. Los compuestos naturales como el quitosano [8] y agentes bioactivos con propiedades antimicrobianas [9] incluyendo a los aceites esenciales [10] y los extractos botánicos [11] pueden incorporarse a estos recubrimientos, siendo sus componentes individuales o en conjunto más eficientes en su modo de acción y con una liberación de manera gradual, ejemplo, el  $\alpha$ -pineno, que forma parte de los extractos activos del nanche (*Byrsonima crassifolia*) [12, 13]. Sin embargo, muchos de estos compuestos son volátiles lo que hace que rápidamente pierdan su efecto antimicrobiano [14, 15]. Para solucionar este problema, se ha hecho uso de la nanotecnología, mediante el encapsulamiento de los agentes bioactivos para mejorar su actividad antimicrobiana [16, 17]. Entre los nanomateriales más empleados en el control de microorganismos se encuentran las nanopartículas metálicas, tales como el oro y la plata [18]; no obstante, actualmente se apuesta por el uso de materiales biodegradables amigables con el medio ambiente [19] como los mencionados anteriormente. Entre las ventajas del uso de las nanopartículas, se reportan el aumento de su reactividad debido a una mayor relación de área superficial por unidad de volumen comparada con el material con mayor tamaño de partícula y por lo tanto, una inhibición del microorganismo más rápida y más efectiva [20, 21].

Por otro lado, el área más activa de la investigación y desarrollo de la nanociencia de los alimentos es el del embalaje o empaque: el mercado global de nanoempaques en alimentos y bebidas fue de 4.130 millones en 2008; con una tasa

de crecimiento anual del 11,65 %. Sobre este tema, Reynolds [22] informó que se comercializan entre 400 a 500 tipos de nanoempaques y se espera que en la próxima década al menos el 25 % de todos los empaques de alimentos serán producidos bajo esta tecnología, con la finalidad de extender la vida útil mediante la reducción del intercambio de gases, humedad, exposición a la luz UV y presencia de microorganismos [23].

Actualmente, se han logrado avances en la producción de nanopartículas (NPs) para liberar ingredientes activos en el control de las enfermedades postcosecha con menores efectos sobre el medio ambiente. En el laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas del CEPROBI-IPN y en colaboración con otras instituciones como la Universidad de Sonora (UNISON), la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN (CNMN-IPN), entre otras, y la participación de estudiantes de licenciatura y posgrado, así como de profesores visitantes en estancias de investigación, se están llevando a cabo investigaciones relacionadas con la síntesis, caracterización y aplicación de nanomateriales solos o adicionados con compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas cuyo objetivo principal es la conservación de productos hortofrutícolas. Especialmente, se ha estudiado la aplicación de cubiertas nanoestructuradas en base al polímero quitosano, adicionadas con agentes bioactivos como los aceites esenciales y extractos botánicos en frutas y hortalizas como el higo, pepino, fresa, jitomate, pimiento morrón y aguacate, entre otros [24-30].

Igualmente, a pesar de la importancia de esta tecnología en el campo de los alimentos, aún hay pocas investigaciones asociadas con su posible toxicidad.

El objetivo de este capítulo entonces fue divulgar a la comunidad científica los avances que ha tenido el grupo de investigación del Laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Hortofrutícolas del CEPROBI-IPN sobre el uso de la nanotecnología en estudios de caracterización de las cubiertas nanoestructuradas, su efecto en evaluaciones *in vitro* e *in situ* y principalmente sobre el control de microorganismos patógenos aislados de frutas y hortalizas de interés comercial y en la calidad de los mismos durante su almacenamiento, además, se reportan los primeros resultados sobre estudios de toxicidad de las nanopartículas en un modelo murino.

## 2. Metodología

### 2.1. Materiales y métodos

#### 2.1.1. Materiales

Se utilizaron quitosanos de mediano peso molecular con grado de desacetilación de 75-85 % (Sigma-Aldrich Chemistry Inc. San Luis, MO, EU) y comercial de alto peso molecular con grado de desacetilación del 91 % (América Alimentos. Ingredientes Funcionales, Zapopan, Jalisco, México). Los aceites esenciales empleados fueron de tomillo (*Thymus vulgaris*) y limón (*Citrus limon*) (Essential Oils-Essencefleu , Rancho La Noria, Ciudad de México, México). En cuanto a los extractos botánicos se emplearon hojas de nanche (*Byrsonyma crassifolia*) y de arándano (*Vaccinium myrtillus*).

#### 2.1.2. Microorganismos (bacterias y hongos)

Se evaluaron bacterias fitopatógenas y de los alimentos [31] Estas fueron: *Pectobacterium carotovorum*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* *Salmonella typhi*, y *Escherichia coli*. Las cepas fúngicas [32] que se han estudiado pertenecen a los siguiente géneros y especies: *Alternaria alternata* la cual se aisló de frutos de higo (*Ficus carica*) y plantas de romero (*Rosmarinus officinalis*). *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. fragariae* se obtuvieron de frutos de guanábana (*Annona muricata*), papaya (*Carica papaya*) y chirimoya (*A. squamosa*). *Rhizopus stolonifer* se obtuvo de frutos de papaya y fresa (*Fragaria x ananassa*) y *Aspergillus flavus* de mazorcas de maíz (*Zea mays*).

### 2.2. Métodos

#### 2.2.1. Síntesis de las nanopartículas y nanocápsulas

Las nanopartículas de quitosano y de quitosano adicionadas con el aceite de limón, de tomillo o extracto de nanche o arándano se sintetizaron siguiendo la metodología de Luque-Alcaraz et al. [33] con ciertas modificaciones y los nanocápsulas de quitosano adicionadas con aceite esencial de tomillo o de limón siguiendo la metodología de Lozano et al. [34].

### 2.2.2. *Preparación de las cubiertas nanoestructuradas*

Los recubrimientos nanoestructurados se elaboraron de acuerdo con las metodologías de Ramos-García et al. [35] y Correa-Pacheco et al. [30] para las diferentes composiciones de quitosano, aceites esenciales y extractos vegetales. Se añadieron los plastificantes aceites de canola 0.1 % y glicerol 0.3 % en todas las formulaciones. Para la preparación de los extractos botánicos se utilizaron los solventes etanol y metanol (Fermont, Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. Monterrey, Nuevo León, México).

### 2.2.3. *Evaluación del efecto in vitro de las nanopartículas y cubiertas nanoestructuradas*

El efecto *in vitro* de las nanopartículas y cubiertas nanoestructuradas para el caso de las bacterias, se evaluó mediante las variables “Halo de inhibición” y “Unidades Formadoras de Colonias (UFC)” mientras que, para los hongos se determinaron el “Crecimiento micelial”, “Inhibición del micelio” y “Germinación de los conidios” [35].

### 2.2.4. *Evaluación del efecto in situ de las cubiertas nanoestructuradas*

El efecto de las cubiertas nanoestructuradas se evaluó directamente sobre frutos y hortalizas cosechados en huertos e invernaderos de la región de Yauatepec, Morelos. Se estudió el aguacate (*Persea americana*) y fresa (*Fragaria* × *ananassa*). Las variables fueron la incidencia (%) y el índice de severidad de la enfermedad. En el caso de la calidad postcosecha se evaluó la pérdida de peso (%), fi meza (N), el contenido de sólidos solubles totales (SST) expresados en °Brix, materia seca (%) (Aguacate) y acidez (tartárico o cítrico) (%), siguiendo las metodologías de Baldoni et al. (2016) [7] y de Barnes et al. (2012) [36].

### 2.2.5. *Caracterización de las nanopartículas de quitosano cargadas con $\alpha$ -pineno y estudio de la toxicidad*

En este estudio se determinó la morfología de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés de transmission electron microscopy) con un microscopio JEM2100 (JEOL USA) con un voltaje de aceleración entre 80 y 200 kV. La distribución del tamaño de partícula y el potencial Z por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés de dynamic

light scattering) fue medida con un equipo Zetasizer Nano ZS90 device (Malvern Instruments, UK). La identificación de grupos funcionales por espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (CRAIC Technologies, USA).

El efecto sobre el comportamiento y toxicidad de las nanopartículas de quitosano cargadas con  $\alpha$ -pineno (NpQ-P) y un recubrimiento nanoestructurado de nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -pineno (RNpQ-P) se evaluó sobre un modelo murino. Se realizó sobre ratones hembra de cepa ICR proporcionadas por el Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS (CIBIS-IMSS), México, llevándose a cabo los experimentos bajo la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999. Para la toxicidad subcrónica, los ratones se dividieron en 3 grupos de 10. Se les administró una dosis de 2.5 mg/g diaria a un volumen de 10  $\mu$ L/g de peso corporal. El comportamiento de los animales se evaluó durante 28 días. Se evaluó el peso del ratón y de los órganos extraídos (hígado y riñón izquierdo). De igual forma se evaluó la hepatotoxicidad con muestras de suero mediante la determinación de la actividad enzimática y la genotoxicidad y citotoxicidad con muestras sanguíneas, siguiendo la metodología de Aguilar-Santamaría et al. [37].

#### 2.2.6. Análisis estadístico

El arreglo de los tratamientos para todos los experimentos se realizó mediante un diseño completo al azar. Los datos se analizaron mediante ANOVA y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ), realizando transformaciones de raíz cuadrada para cumplir los supuestos del ANOVA en algunos casos.

### 3. Resultados y discusión

A continuación, en las Tablas 1-8 y en las Figuras 1 y 2, se presentan los resultados del estudio *in vitro* e *in situ* de los productos agrícolas evaluados y la comparación entre cubiertas a base de quitosano y nanoestructuradas de quitosano solo o adicionado con los agentes bioactivos: aceites esenciales y extractos botánicos, y su efecto en el desarrollo de microorganismos patógenos en la calidad postcosecha del fruto u hortaliza.

### 3.1. Evaluación del efecto de las nanopartículas y cubiertas nanoestructuradas adicionadas con aceites esenciales en el desarrollo de in vitro de bacterias patógenas

En esta sección, se muestran los resultados del efecto de las nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano adicionadas con aceites esenciales de limón o tomillo sobre bacterias fitopatógenas como *P. carotovorum* (Tabla 1) y de nanopartículas y nanocápsulas adicionadas con aceite esencial de limón (Tablas 2 y 3) y con aceite esencial de tomillo (Figura 1) en bacterias presentes en los alimentos.

En la Tabla 1 se observa que el mayor halo de inhibición fue para las nanopartículas de quitosano (NpQ-AET) con aceite esencial de tomillo en concordancia con la menor cantidad de UFC encontradas. En la literatura se ha reportado la eficacia de nanopartículas de quitosano con aceite esencial de tomillo en la inhibición de *P. carotovorum* [27, 38] debido a su mecanismo de acción donde la pared celular de la bacteria y las estructuras de la membrana se deforman, y rompen causando la fuga de compuestos intracelulares [39].

Tabla 1. Efecto de nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano adicionadas con aceites esenciales de limón o tomillo sobre el desarrollo de *P. carotovorum*.

Tratamientos	Halo de inhibición* (mm)	UFC
NpQ (0.05 %)	15.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	Incontables
NpQ (0.05 %) con AEL (20 %)	13.0 ± 0.1 <sup>c</sup>	450
NpQ (0.05 %) con AET (5 %)	24.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	240
Testigo Medio nutritivo ATP	0 ± 0.0 <sup>d</sup>	Incontables

NpQ = nanopartículas de quitosano; AEL = aceite esencial de limón; AET = aceite esencial de tomillo; Los datos representan la media ± desviación estándar. \*Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey,  $P < 0.05$ )

En las Tablas 2 y 3, se observa que a medida que aumenta la concentración, se incrementa el halo de inhibición, tanto para las nanopartículas como para las nanocápsulas de quitosano solo y adicionadas con aceite esencial de limón para todas las bacterias evaluadas. Por otra parte, se tiene que las nanopartículas fueron más efectivas en su efecto inhibitorio comparadas con las nanocápsulas. Se ha reportado en la literatura [40, 41] que, en el caso de las nanopartículas, el aceite es adsorbido en la superficie de las mismas siendo su liberación más rápida. En las nanocápsulas el aceite está contenido en el interior de estas y debe atravesar la pared de la misma para ser liberado. De igual forma, se ha demostrado el efecto antibacteriano tanto del quitosano [42] como del aceite esencial de limón [43].



Tabla 2. Efecto de la concentración de nanopartículas y nanocápsulas de quitosano y de quitosano adicionadas con aceite esencial de limón, obtenidas por los métodos de nanoprecipitación y nanoencapsulación, respectivamente, en el desarrollo de bacterias presentes en los alimentos.

Bacteria	Tratamiento	Concentración (μl)					
		5		2.5		1.25	
		NP	NC	NP	NC	NP	NC
Halo de inhibición (cm)*							
<i>S. aureus</i>	NpQ	1.5 <sup>c</sup>	0.0 <sup>f</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
	NpQ-AEL	1.5 <sup>b</sup>	0.2 <sup>g</sup>	1.4 <sup>b</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.0 <sup>c</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	NpQ	1.8 <sup>b</sup>	0.0 <sup>f</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.9 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>
	NpQ- AEL	1.2 <sup>c</sup>	0.2 <sup>g</sup>	1.1 <sup>c</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.0 <sup>c</sup>
<i>S. dysenteriae</i>	NpQ	2.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>f</sup>	1.6 <sup>a</sup>	0.0 <sup>e</sup>	1.4 <sup>a</sup>	0.0 <sup>c</sup>
	NpQ- AEL	2.5 <sup>a</sup>	0.4 <sup>f</sup>	1.8 <sup>a</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.3 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>
<i>E. coli</i>	NpQ	1.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>f</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>
	NpQ- AEL	1.2 <sup>c</sup>	0.0 <sup>h</sup>	1.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>

NpQ = nanopartículas de quitosano; NP = nanoprecipitación; NC = nanoencapsulación; AEL = aceite esencial de limón. \*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Tabla 3. Efecto de la concentración de nanopartículas y nanocápsulas de quitosano y de quitosano adicionadas con aceite esencial de limón, obtenidas por los métodos de nanoprecipitación y nanoencapsulación, respectivamente, en el desarrollo de 4 bacterias presentes en los alimentos.

Bacteria	Tratamiento	Concentración (μl)					
		40		20		10	
		NP	NC	NP	NC	NP	NC
Halo de inhibición (cm)*							
<i>S. aureus</i>	Q	2.9 <sup>c</sup>	1.4 <sup>f</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.2 <sup>d</sup>	1.6 <sup>c</sup>	0.6 <sup>e</sup>
	Q-AEL	3.3 <sup>b</sup>	1.2 <sup>g</sup>	1.8 <sup>d</sup>	0.5 <sup>h</sup>	1.7 <sup>c</sup>	0.3 <sup>h</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	Q	3.3 <sup>a</sup>	0.8 <sup>i</sup>	2.0 <sup>b</sup>	0.5 <sup>g</sup>	1.9 <sup>b</sup>	0.0 <sup>f</sup>
	Q-AEL	1.8 <sup>c</sup>	1.3 <sup>g</sup>	2.0 <sup>c</sup>	0.9 <sup>g</sup>	1.6 <sup>c</sup>	0.4 <sup>h</sup>
<i>S. dysenteriae</i>	Q	3.1 <sup>b</sup>	0.0 <sup>h</sup>	2.2 <sup>a</sup>	0.0 <sup>h</sup>	2.2 <sup>a</sup>	0.0 <sup>f</sup>
	Q-AEL	3.5 <sup>a</sup>	1.5 <sup>f</sup>	2.9 <sup>a</sup>	1.0 <sup>g</sup>	2.6 <sup>a</sup>	0.6 <sup>h</sup>
<i>E. coli</i>	Q	2.8 <sup>c</sup>	0.0 <sup>h</sup>	2.1 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>h</sup>	2.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>f</sup>
	Q-AEL	3.0 <sup>c</sup>	1.0 <sup>h</sup>	2.2 <sup>b</sup>	0.6 <sup>h</sup>	2.0 <sup>b</sup>	0.4 <sup>h</sup>

Q = quitosano; AEL = aceite esencial de limón; NP = nanopartículas elaboradas por nanoprecipitación; NC = nanocápsulas elaborados por nanoencapsulación; AEL = aceite esencial de limón. \*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

La Figura 1 muestra el efecto antibacteriano de las nanopartículas de quitosano y de las nanocápsulas de quitosano que contienen aceite esencial de tomillo sobre el crecimiento de 6 bacterias presentes en los alimentos: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *E. coli*. Las variables que

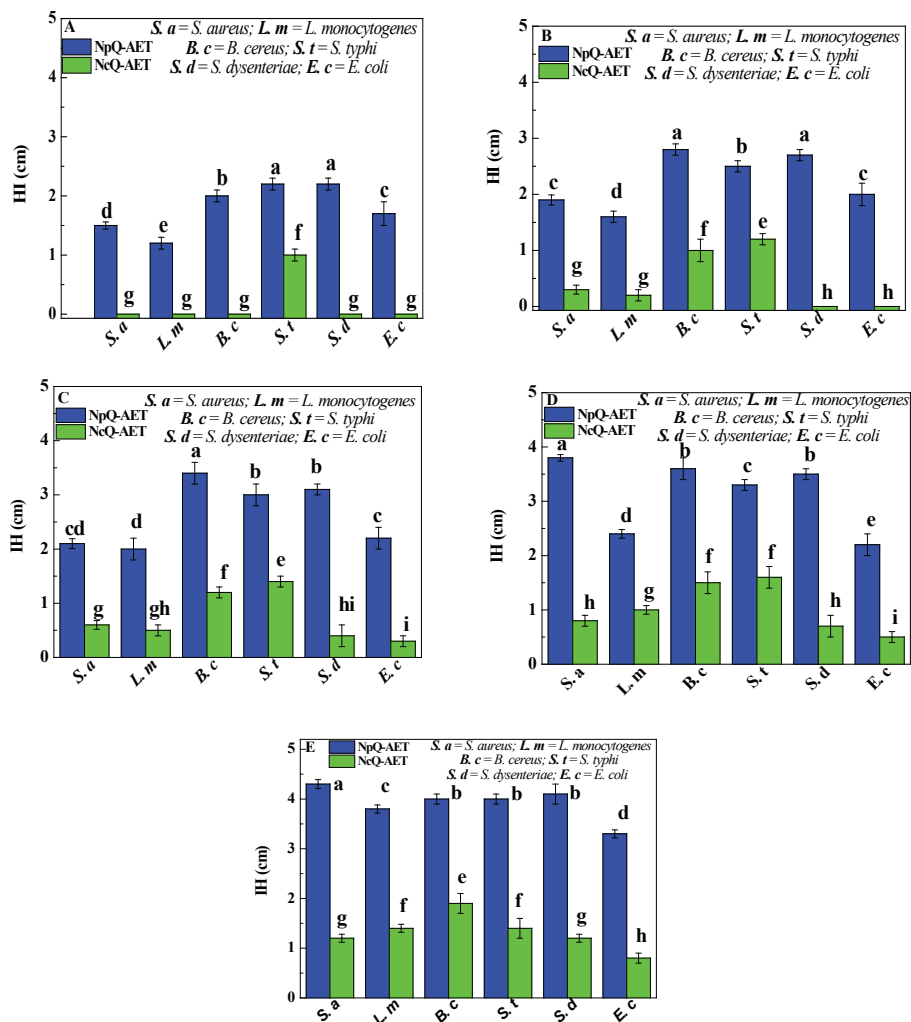


Figura 1. Efecto de las nanopartículas de quitosano (NpQ) y nanocápsulas de quitosano (NcQ) adicionadas con aceite esencial de tomillo (AET) sobre el crecimiento (halo de inhibición) de bacterias de los alimentos en diferentes concentraciones A) 2.5 µL, B) 5 µL, C) 10 µL, D) 20 µL and E) 40 µL de volumen mínimo inhibitorio. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

se presentan son la medición del halo de inhibición (HI) con relación a los diferentes volúmenes considerados como volumen mínimo inhibitorio (2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{L}$ ). Se observa que el efecto inhibitorio fue mayor para las nanopartículas que para las nanocápsulas con aceite esencial de tomillo. De igual forma que este fue mayor para el volumen de 40  $\mu\text{L}$ , siendo el halo de inhibición de 4.3 cm para *S. aureus* en el caso de las nanopartículas y de 1.9 cm para *B. cereus* para las nanocápsulas. Además de lo explicado anteriormente sobre la diferencia de liberación del aceite entre nanopartículas y nanocápsulas, se ha reportado en la literatura que partículas de tamaño más pequeño, pueden destruir con mayor facilidad la membrana celular de las bacterias teniendo en consecuencia una mayor actividad bactericida [44, 45]. En este trabajo se observó un tamaño de nanopartículas ( $6.4 \pm 0.5$  nm) menor que de nanocápsulas ( $9.1 \pm 1.6$  nm) [38].

### ***3.2. Evaluación del efecto de las nanopartículas de quitosano y de nanopartículas adicionadas con extractos vegetales de arándano y nanche o aceite esencial de tomillo en el desarrollo de in vitro de hongos fitopatógenos***

En la Tabla 4 se observan los resultados del efecto *in vitro* de los diferentes tratamientos con nanopartículas de quitosano (NpQ) y con nanopartículas de quitosano adicionadas con extracto etanólico de arándano (NpQ-EEA) para concentraciones de 0.05 % (NpQ) y del 5 % para el extracto etanólico (EEA), de igual forma para quitosano solo al 2 %, observando diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Se obtuvo que el mayor porcentaje de inhibición micelial fue sobre el hongo *A. alternata* fue para el aislado de higo a un volumen de 500  $\mu\text{l}$  tanto para las NpQ como para las NpQ-EEA. En cuanto a la inhibición de la germinación y la esporulación para el aislado de romero, hubo 100 % de inhibición y 0 esporas  $\text{ml}^{-1}$  para las NpQ a al mayor volumen (500  $\mu\text{l}$ ). Por lo tanto, el tratamiento con NpQ a un volumen de 500  $\mu\text{l}$  resultó ser el más efectivo en la inhibición tanto del aislado de higo como del de romero. El efecto de inhibición de las NpQ sobre hongos ha sido ampliamente reportado en la literatura [46]. Por otra parte, el efecto antifúngico de NpQ-EEA no está reportado por otros autores. Sin embargo, se ha estudiado que extractos botánicos han resultado menos efectivos que el quitosano en la inhibición del crecimiento micelial de hongos y en ocasiones han mostrado un efecto contrario, estimulando la esporulación [47].

Tabla 4. Efecto de quitosano, nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano adicionadas con extracto etanólico de arándano, en el desarrollo *in vitro* de *A. alternata* aislado de higo y romero, por un periodo de incubación de 7-8 días a una temperatura de incubación de 28 °C.

Tratamientos	Volumen ( $\mu$ l)	<i>A. alternata</i> (higo) Inhibición micelial (%)	<i>A. alternata</i> (romero)		
			Inhibición micelial (%)	Inhibición de la germinación (%)	Esporulación (esporas ml <sup>-1</sup> )*
PDA		0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	26.0 <sup>a</sup>	1.63 x 10 <sup>8a</sup>
Q		6.0 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	37.5 <sup>a</sup>	9.3 x 10 <sup>7b</sup>
NpQ	250	50.2 <sup>b</sup>	47.7 <sup>b</sup>	41.1 <sup>a</sup>	1.7 x 10 <sup>7c</sup>
NpQ	500	83.1 <sup>c</sup>	83.0 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>
NpQ-EEA	250	50.3 <sup>b</sup>	43.8 <sup>b</sup>	45.2 <sup>ab</sup>	1.57 x 10 <sup>7c</sup>
NpQ-EEA	500	83.3 <sup>c</sup>	76.5 <sup>c</sup>	75.1 <sup>b</sup>	1.33 x 10 <sup>6c</sup>

PDA = agar papa dextrosa, Q = quitosano; NpQ = nanopartículas de quitosano; NpQ-EEA = nanopartículas de quitosano con extracto etanólico de arándano. \*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

La Tabla 5 muestra el efecto *in vitro* de los diferentes tratamientos con NpQ y con nanopartículas de quitosano adicionadas con extracto metanólico de nanche (NpQ-EMN) para concentraciones de 0.05 % (NpQ) y del 5 % para el extracto etanólico de nanche (EEA) y quitosano solo al 2.5 % para volúmenes de 250, 500 y 750  $\mu$ l y comparando con Sportak, un fungicida comercial a un volumen de 0.01 ml. Existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). La mayor inhibición micelial se observó para las NpQ-EMN para los volúmenes de 500 y 750  $\mu$ l y para el fungicida comercial Sportak tanto para el aislado de papaya como para el de guanábana, mostrando un 100 % de inhibición de la germinación de *C. gloeosporioides*. Igualmente, a medida que aumenta la concentración, se incrementa el efecto sobre el hongo pasando de fungistático a fungicida. Este comportamiento es contrario al del extracto de arándano sobre *A. alternata*, lo cual puede deberse a la composición o a una menor volatilización de este o a su mecanismo de acción sobre el hongo como se mencionó anteriormente, existiendo en este caso, un efecto sinérgico entre el extracto metanólico de nanche y las nanopartículas de quitosano. El efecto de NpQ sobre *C. gloeosporioides* ha sido reportado por otros autores [48, 49].

Tabla 5. Efecto de quitosano, nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano adicionadas con extracto metanólico de nanche, en el desarrollo *in vitro* de *C. gloeosporioides* aislado de papaya y guanábana, por un periodo de incubación de 7-8 días a una temperatura de incubación de 28 °C.

Tratamientos	Volumen ( $\mu$ l)	Papaya		Guanábana	
		Inhibición micelial (%)	Inhibición de la germinación (%)	Inhibición micelial (%)	Inhibición de la germinación (%)
PDA		0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>
Q		9.4 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>	9.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>
NpQ	250	19.4 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>	33.0 <sup>b</sup>	7.0 <sup>b</sup>
NpQ	500	53.4 <sup>c</sup>	0.0 <sup>a</sup>	49.0 <sup>c</sup>	8.0 <sup>b</sup>
NpQ	750	57.0 <sup>c</sup>	11.0 <sup>b</sup>	59.4 <sup>d</sup>	7.0 <sup>b</sup>
NpQ-EMN	250	44.0 <sup>d</sup>	47.0 <sup>c</sup>	52.8 <sup>c</sup>	10.0 <sup>b</sup>
NpQ-EMN	500	71.2 <sup>e</sup>	100 <sup>d</sup>	82.0 <sup>e</sup>	100 <sup>c</sup>
NpQ-EMN	750	79.6 <sup>f</sup>	100 <sup>d</sup>	82.0 <sup>e</sup>	100 <sup>c</sup>
Sportak		80.0 <sup>f</sup>	100 <sup>d</sup>	82.0 <sup>e</sup>	100 <sup>c</sup>

PDA = agar papa dextrosa, Q = quitosano; NpQ = nanopartículas de quitosano; NpQ-EMN = nanopartículas de quitosano con extracto metanólico de nanche. \*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

En la Tabla 6, se observan los resultados de las cubiertas nanoestructuradas con quitosano y quitosano adicionado con aceite esencial de tomillo en la inhibición micelial y en la germinación de hongos fitopatógenos aislados de diferentes frutos para una concentración de aceite esencial de tomillo del 5 %, aceite de canola 0.1 % y glicerol 0.3 %. se observan diferencias significativas entre tratamientos. Se observa como a medida que aumenta la concentración de las NpQ-AET de 50, 53 a 55 % en la formulación, hubo una mayor inhibición del crecimiento micelial llegando hasta un 100 % para un 55 % de NpQ-AET para todos los hongos estudiados si presentar germinación. Estos resultados concuerdan con los reportados por Zahid y colaboradores [50] y Correa-Pacheco et al. [30] para *C. gloeosporioides* aplicando nanoemulsiones de quitosano y cubiertas nanoestructuradas de NpQ-AET, en aislados de pitahaya y aguacate, respectivamente.

Tabla 6. Efecto de las cubiertas nanoestructuradas de quitosano con aceite esencial de tomillo (AET) en la inhibición micelial y germinación de hongos fitopatógenos al final del periodo de incubación.

Tratamientos	(%) Inhibición micelial / (%) germinación					
	<i>A. alternata</i> (higo)	<i>C. gloeosporioides</i> (papaya)	<i>C. gloeosporioides</i> (guanábana)	<i>C. fragariae</i> (chirimoya)	<i>R. stolonifer</i> (papaya)	<i>R. stolonifer</i> (fresa)
PDA	0 <sup>a</sup> /85 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup> /92 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup> /97 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> /100 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> /95 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> /94 <sup>b</sup>
Q 98.6 % + NpQ-AET 1.0 %	0 <sup>a</sup> /46 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> /90 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup> /95 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> /97 <sup>bc</sup>	0 <sup>a</sup> /100 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> /95 <sup>b</sup>
Q 89.6 % + NpQ-AET 10 %	0 <sup>a</sup> /57 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> /89 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup> /94 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> /96 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> /99 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup> /96 <sup>bc</sup>
Q 49.6 % + NpQ-AET 50 %	19.2 <sup>b</sup> /90 <sup>c</sup>	17.7 <sup>b</sup> /89 <sup>a</sup>	30.0 <sup>b</sup> /98 <sup>c</sup>	85.0 <sup>b</sup> /95 <sup>b</sup>	72.5 <sup>b</sup> /84 <sup>b</sup>	62.0 <sup>b</sup> /92 <sup>b</sup>
Q 46.6 % + NpQ-AET 53 %	70.2 <sup>c</sup> /0 <sup>a</sup>	65.0 <sup>c</sup> /91 <sup>ab</sup>	92.0 <sup>c</sup> /100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup> /0 <sup>a</sup>	100 <sup>c</sup> /0 <sup>a</sup>	62.4 <sup>b</sup> /0 <sup>a</sup>
Q 44.6 % + NpQ-AET 55 %	100 <sup>d</sup> /0 <sup>a</sup>	100 <sup>d</sup> /99 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup> /0 <sup>a</sup>	100 <sup>c</sup> /0 <sup>a</sup>	100 <sup>c</sup> /0 <sup>a</sup>	100 <sup>c</sup> /0 <sup>a</sup>

PDA = agar papa dextrosa; Q = quitosano; NpQ = nanopartículas de quitosano; AET = aceite esencial de tomillo. \*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Valores de  $P$  después de ser transformados.

### 3.3. Evaluación del efecto de la aplicación de cubiertas nanoestructuradas en el control de hongos fitopatógenos y en la calidad postcosecha de aguacate y fresa

En la Tabla 7, se muestran los resultados de la evaluación *in situ* de las cubiertas sobre el aguacate cv Hass. Se observa que la incidencia de la enfermedad fue mayor para el fruto sin cubierta (84.6 %) comparado con el fruto con cubierta (54.0 %) al igual que el índice de severidad con 2.6 y 1.7, respectivamente, observándose diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos valores. Notoriamente, la firmeza se mantuvo en mayor grado para el fruto con cubierta. Por otra parte, la calidad de la fruta no se vio afectada por la cubierta ya que no se observaron diferencias estadísticas significativas para la pérdida de peso, SST, contenido de materia seca (CMS) y acidez. Se ha demostrado en la literatura la efectividad del AET en

conjunto con el quitosano para reducir la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en aguacate, cuyo modo de acción se asocia a la alteración de la membrana del hongo y al contenido de fenoles del aceite que los sitios de activaciones de las enzimas fúngicas y el metabolismo celular del mismo [51, 52].

Tabla 7. Efecto de las cubiertas nanoestructuradas de quitosano y aceite esencial de tomillo en el desarrollo de *C. gloeosporioides* y en la calidad postcosecha del aguacate cv “Hass” por un periodo de 8 días de almacenamiento.

Tratamientos	Incidencia* (%)	Severidad*	Pérdida de peso* (%)	SST* (°Brix)	Firmeza* (N)	CMS* (%)	Acidez* (%)
Sin cubierta	84.6 <sup>a</sup>	2.6 <sup>a</sup>	11.51 <sup>a</sup>	0.88 <sup>a</sup>	18.6 <sup>a</sup>	22.6 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>
Con cubierta	54.0 <sup>b</sup>	1.7 <sup>b</sup>	11.76 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>	30.2 <sup>b</sup>	22.9 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>

Escala del índice de severidad: 1 = 0 %, 2 = 1-25 %, 3 = 26-50 %, 4 = 51-75 % y 5 = 76-100 % de la superficie de la fruta con síntomas de antracnosis. \*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

La Figura 2, muestra los resultados de la aplicación de cubiertas nanoestructuradas sobre la respuesta en las variables de firmeza, acidez y SST en fresas inoculadas con el hongo *C. fragariae* durante un periodo de 9 días de almacenamiento

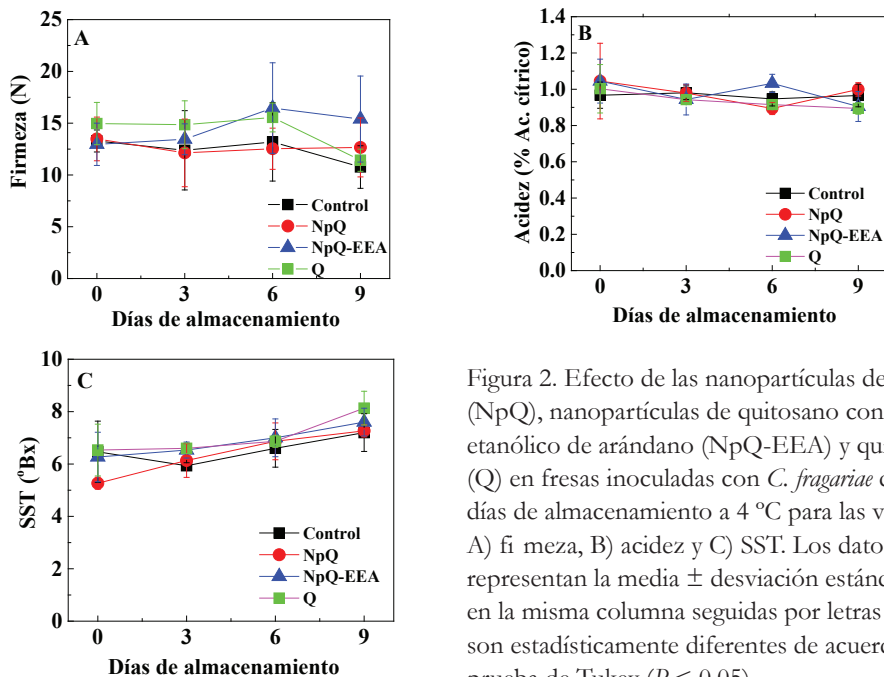


Figura 2. Efecto de las nanopartículas de quitosano (NpQ), nanopartículas de quitosano con extracto etanólico de arándano (NpQ-EEA) y quitosano (Q) en fresas inoculadas con *C. fragariae* durante 9 días de almacenamiento a 4 °C para las variables: A) firmeza, B) acidez y C) SST. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

a una temperatura de 4 °C. Los tratamientos corresponden a 75  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de las NpQ y de NpQ-EAA, y 1.5 % de Q, además de un grupo control para frutos sin cubiertas. Se obtuvo que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni días para las variables evaluadas. Esto pudo deberse al grado uniforme de madurez de los frutos. Vargas y colaboradores [53] reportaron este mismo comportamiento para fresas almacenadas a 4 °C con cubiertas de quitosano y ácido oleico para la acidez y SST. De igual forma, los SST mostraron este mismo comportamiento para fresas recubiertas con diferentes concentraciones de propóleo y NpQ a la misma temperatura de refrigeración [54, 55].

### ***3.4. Caracterización de nanopartículas de quitosano y pineno y su toxicidad en un modelo murino***

El ensayo de toxicidad en un modelo murino solo se realizó para las nanopartículas de quitosano cargadas con el pineno y el recubrimiento elaborado con estas nanopartículas.

La Figura 3A muestra NpQ-P de forma esférica con un tamaño de  $5 \pm .07\text{nm}$ . Asimismo, presenta una distribución binomial en la cual 81.5 % de su población tiene un tamaño de  $3.9 \pm .5 \text{ nm}$  y un potencial Z de 13.4 a 14.9 mV (Figura 3B). Este tamaño de partículas ya fue reportado en trabajos similares del grupo de investigación para nanopartículas de quitosano con aceite esencial de limón [19]. En el análisis de FTIR de la Figura 3C, se encontraron los grupos hidroxilos y amino característicos de Q, NpQ y NpQ-P correspondientes a las longitudes de onda de  $3400\text{-}3800 \text{ cm}^{-1}$  y  $1400$  y  $1560\text{cm}^{-1}$ , respectivamente [56]. En el espectro del P (pineno) y NpQ-P se observó la superposición de las señales de estiramiento de los grupos aromáticos del pineno entre  $3200\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$  y del grupo metilo entre  $2880\text{-}2860 \text{ cm}^{-1}$  con el grupo amino, evidenciándose la presencia de los grupos aromáticos del pineno y la matriz del quitosano, como consecuencia del encapsulamiento o formación de enlaces entre ellos.

La toxicidad subcrónica en el modelo murino fue evaluada después de 28 días de la administración por vía oral de la dosis de 2.5 g/kg de peso corporal de las NpQ-P y RNpQ-P. No hubo muerte en los ratones ni se presentaron conductas anormales como se observa en la Tabla 8. Autores como Aguilar-Santamaría [37] administraron extracto etanólico, metanólico y acuoso de arnica roja (*Galphimia glauca*), reportando cambios en la disminución en los reflejos y el aumento en la deshidratación, letargo y piloerección en comparación con los ratones testigo. Por



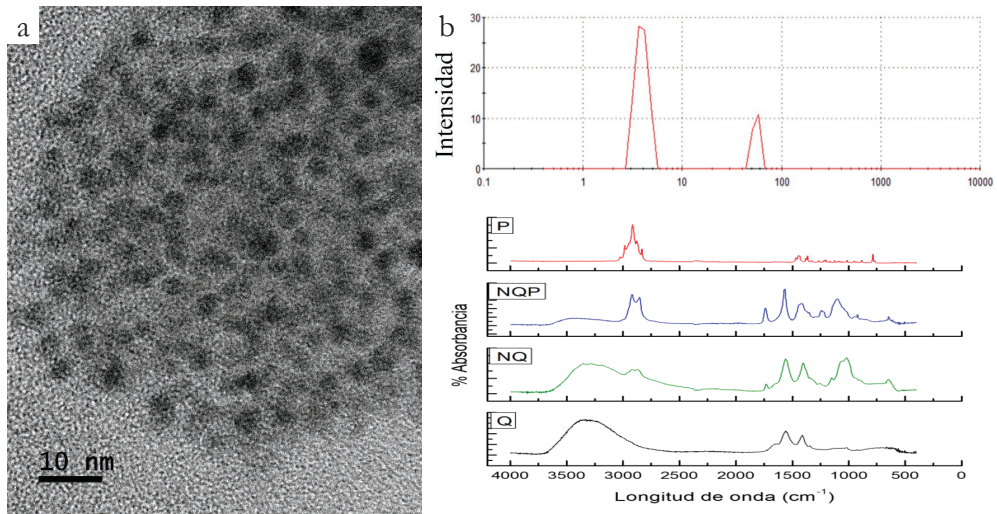


Figura 3. Caracterización del quitosano (Q), nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -pineno (NpQ-P) y  $\alpha$ -pineno (P): A) Micrografía de NpQ-P por TEM, B) Distribución de tamaño de partículas NpQ-P por DLS y C) Espectro FTIR de Q (negro), NQ (verde), NpQ-P (azul) y P (rojo).

lo tanto, al no presentarse cambios en la conducta del ratón, es indicativo de daños a nivel de sistema nervioso central, lo cual no se observó en el presente ensayo.

Tabla 8. Variables conductuales para el ensayo de toxicidad subcrónica observados durante 28 días en ratones hembra ICR.

	Agua destilada	NpQ-P	RNpQ-P
Agarre de fuerza	N	N	N
Reflejo	N	N	N
Equilibrio	N	N	N
Alarma	N	N	N
Defecación/urinación	N	N	N
Piloerección	NP	NP	NP
Deshidratación	NP	NP	NP
Ataxia	NP	NP	NP
Letargo	NP	NP	NP

N: Normal; NP: No presentó; NpQ-P = nanopartículas de quitosano cargadas con  $\alpha$ -pineno; (RNpQ-P) =recubrimiento nanoestructurado de nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -pineno.

Por otra parte, se evaluó el peso corporal y la diferencia de peso hígado/riñón de cada animal semanalmente hasta el día 28. En cuanto al peso, se observó un

incremento entre los grupos dentro de los parámetros normales sin diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) y la proporción en porcentaje del peso del hígado y del riñón no mostró diferencias estadísticas significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ) como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Efecto de las NPQ-P y del RNpQ-P en el peso del ratón, hígado y riñón.

Tratamientos	Peso del ratón (g)				Relación órgano/ peso corporal (%)	
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Hígado	Riñón
Agua destilada	26.3±2.8 <sup>a</sup>	26.3±2.4 <sup>a</sup>	27.1±2.5 <sup>a</sup>	27.1±2.3 <sup>a</sup>	5.5±0.4 <sup>a</sup>	0.6±0.05 <sup>a</sup>
NpQ-P	26.0±0.7 <sup>a</sup>	26.4±1.4 <sup>a</sup>	27.5±1.8 <sup>a</sup>	28.1±1.6 <sup>a</sup>	5.8±0.8 <sup>a</sup>	0.7±0.04 <sup>a</sup>
RNpQ-P	26.0±0.8 <sup>a</sup>	26.0±1.6 <sup>a</sup>	26.0±1.2 <sup>a</sup>	25.4±2.5 <sup>a</sup>	6.0±0.3 <sup>a</sup>	0.7±0.07 <sup>a</sup>

\*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Peso de hígado de ratón ( $F = 1.1514$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0.252$ ) y de riñón ( $F = 3.654$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0.051$ ). NPQ-P = NpQ-P = nanopartículas de quitosano cargadas con  $\alpha$ -pineno; (RNpQ-P) = recubrimiento nanoestructurado de nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -pineno.

La medición de la hepatotoxicidad mediante los perfiles de actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FAL), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) no mostraron diferencias significativas de los tratamientos comparados con el testigo, sin causar un aumento en la actividad enzimática, demostrando que no son tóxicos ya que no afectaron al animal a nivel hepático. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Actividad enzimática de FAL, ALT y AST en suero de ratón expuestos por 28 días a las NpQ-P y al RNpQ-P.

UI/L	Agua destilada	NpQ-P	RNpQ-P
ALT	6.5±2.8 <sup>a</sup>	10.3±1.6 <sup>a</sup>	7.2±2.4 <sup>a</sup>
AST	13.4±5.0 <sup>a</sup>	17.3±3.8 <sup>a</sup>	22.1±5.8 <sup>a</sup>
FAL	47.4±12.3 <sup>a</sup>	41.4±11.2 <sup>a</sup>	37.4±10.8 <sup>a</sup>

\*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). FAL = fosfatasa alcalina; ALT = alanina aminotransferasa; AST = aspartato aminotransferasa; NpQ-P = nanopartículas de quitosano cargadas con  $\alpha$ -pineno; (RNpQ-P) = recubrimiento nanoestructurado de nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -pineno.

En la Tabla 11, se observan los resultados de las pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad, mostraron que hubo un incremento positivo y no dañino para el modelo murino estudiado ya que los valores de EPC/1000ET (EPC = eritrocitos

policromáticos, ET = eritrocitos totales) presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para NpQ-P comparados con el control ( $p = 0.001$ ). De igual forma, los valores de EMN/10000ET (EMN = eritrocitos micronucleados) presentaron diferencias estadísticas entre el control y el tratamiento con NpQ-P ( $p = 0.006$ ), con una disminución de los EMN indicando que no hubo lesiones cromosómicas inducidas. Entre el control y el recubrimiento nanoestructurado (RNpQ-P) no se observaron diferencias estadísticas tanto para EPC como para EMN. En cuanto a los valores de EPCMN/1000EPC (EPCMN = eritrocitos policromáticos micronucleados) no se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Debido a que no hubo un aumento de la cantidad de micronúcleos lo cual se relaciona con daños a nivel genéticos y al no presentarse diferencias significativas en los valores de EPCMN, se concluye que no hubo genotoxicidad a diferencia de otros trabajos [37] donde si se ha reportado genotoxicidad en modelos murinos usando extractos de berenjena espinosa (*Solanum chrysotrichum*) a una concentración de  $1\text{g}/\text{kg}^{-1}$  de peso. Esto se explicó por una disminución en EPC y EMN en comparación en los testigos tanto positivo como negativo, ciclo-fosfamida y placebo, respectivamente.

Tabla 11. Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad de NpQ-P y RNpQ-P.

Tratamientos	EPC/1000ET	EMN/10000ET	EPCMN/1000EPC
Agua destilada	21.0±3.4 <sup>ab</sup>	3.7±0.8 <sup>a</sup>	1.7±1.0 <sup>a</sup>
NpQ-P	26.3±2.4 <sup>a</sup>	2.0±0.6 <sup>b</sup>	1.7±1.0 <sup>a</sup>
RNpQ-P	18.7±2.1 <sup>b</sup>	4.7±1.9 <sup>a</sup>	1.3±0.5 <sup>a</sup>

\*Medias en la misma columna seguidas por letras diferentes son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). NpQ-P = nanopartículas de quitosano cargadas con  $\alpha$ -pineno; (RNpQ-P) = recubrimiento nanoestructurado de nanopartículas de quitosano con  $\alpha$ -pineno; EPC = eritrocitos policromáticos, ET = eritrocitos totales; EMN = eritrocitos micronucleados; EPCMN = eritrocitos policromáticos micronucleados. Conteo de EPC/1000 ET ( $F = 12.56$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0.001$ ), EMN/10000 ET ( $F = 7.206$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0.006$ ) y EPCMN/1000 EPC ( $F = 0.278$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0.761$ ).

#### 4. Conclusiones

Los resultados demostraron que el aceite esencial de tomillo incorporado en las NpQ fue efectivo en la inhibición *in vitro* e *in vivo* para los diferentes microorganismos estudiados. En cuanto a los extractos botánicos, el efecto inhibitorio fue diferente dependiendo del extracto, en algunos casos fue mayor para NpQ con el extracto encapsulado (EMN) y en otros fue menor (EEA) comparado con cubiertas con NpQ solas. De igual forma, las nanopartículas fueron más

efectivas que las nanocápsulas de quitosano tanto con AEL como con el AET en el control de microorganismos a las mayores concentraciones de agente bioactivo usado. En general, la aplicación de las cubiertas nanoestructuradas inhibieron notablemente el desarrollo de los microorganismos patógenos en relación a los frutos no tratados, presentando la adición de agentes bioactivos como aceites esenciales o extractos botánicos un efecto sinérgico y en la mayoría de los casos sin afectar la vida de anaquel de los frutos tratados durante el almacenamiento. En el desarrollo de cubiertas nanoestructuradas es importante considerar factores como concentración de los componentes en las formulaciones, el tipo de inóculo y el hospedero. Por otra parte, debido a la ausencia de regulaciones sobre los nanomateriales, existen muchas inquietudes respecto al impacto sobre las personas y el medio ambiente en el largo plazo. De tal manera que se requieren más estudios en la aplicación de la nanotecnología en el procesamiento y empaque, nanotoxicidad, regulación, análisis de riesgos y beneficio .

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo. De igual forma a la Red de Nanociencia y Micro Nanotecnología del IPN.

## Bibliografía

1. He, X., Deng, H., & Hwang, H. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *J. Food Drug Anal.*, 27, 1-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002>
2. FAO SOFA report 2019: *New insights into food losses and waste*. <https://www.ifpri.org/blog/fao-sofa-report-2019-new-insights-food-loss-and-waste> [Fecha de acceso febrero del 2021].
3. Bautista-Baños, S. (2014). *Postharvest Decay. Control Strategies* (1<sup>ra</sup> edición). Academic Press, Elsevier, UK.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00001-6>
4. Singh, D., & Sharma, R. R. (2018). Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management. En Siddiqui, M. W. (Ed.), *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. Academic Press, Elsevier, UK.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00001-7>
5. Ventura-Aguilar, R. I., Bautista-Baños, S., Flores-García, G., & Zavaleta-Avejar, L. (2018). Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds in *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food Chem.*, 262, 421-149.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.063>
6. Jiang, G., Zhang, Z., Li, F., Rui, X., & Aisa, H. K. (2021). A comprehensive review on the research progress of vegetable edible film . *Arab. J. Chem.*, 14(103049), 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103049>
7. Baldoni, D., Ventura-Aguilar, R.I., Hernández-López, M., Corona-Rangel, M.L., Barrera-Necha, L.L., Correa-Pacheco, Z. et al. (2016). Calidad postcosecha de higos 'black mission' tratados con cubiertas naturales. *Rev. Iberoam. Tecnol. Postcosecha*, 17(2), 267-275.
8. Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: A versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest-A review. *Rev. Chapingo ser. Horticultura*, 23(2), 103-121.  
<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
9. Abdollahzadeh, E., Nematollahi, A., & Hosseini, H. (2021). Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. *Trends Food Sci. Tech.*, 110, 291-303.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.084>
10. Yousuf, B., Wu, S., & Siddiqui, M. W. (2021). Incorporating essential oils or compounds derived thereof into edible coatings: Effect on quality and shelf life of fresh/fresh-cut produce. *Trends Food Sci. Tech.*, 108, 245-257.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.016>

11. Kouhi, M., Prabhakaran, P., & Ramakrishna, S. (2020). Edible polymers: An insight into its application in food, biomedicine and cosmetics. *Trends Food Sci. Tech.*, 103, 248-263. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.025>
12. Hui-Ting, C., Ying-Hung, C., Chi-Lin, W., Shang-Tzen, C., Tun-Tschu, C., & Yu-Chang, S. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *Formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *J. Biores. Technol.*, 99, 6266-6270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.005>
13. Alishahi, A., Mirvaghe, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Shojaosadati, S.A., Dorkoosh, F. A. et al. (2011). Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chem.*, 126, 935-940. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.086>
14. Rowe, D. J. (2005). *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. CRC Press, USA. <https://doi.org/10.1002/9781444305517>
15. Mandal, S., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). *Essential of Botanical Extractions. Principles and Applications*. Academic Press, Elsevier, UK.
16. Al-Tayyar, N. A., Youssef, A., & Al-Hindi, R. (2020). Edible coatings and nanoemulsions for enhancing shelf life and reducing foodborne pathogens of fruits and vegetables: A review. *Sustain. Mater. Technol.*, 26(e00215), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2020.e00215>
17. Chawla, R., Sivakumar, S., & Kaur, H. (2021). Antimicrobial edible films in food packaging: Current scenario and recent nanotechnological advancements- a review. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, 2(100024), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100024>
18. Jesse, I. A., Mamman, P. G., Umar, A. O., Aliyu, A. M., Ibrahim, H. O., Busari, M. B. et al. (2018). Application of nanoparticles in the control and management of pathogenic microorganisms. *J. Public Health Dis.*, 1(2), 15-21.
19. Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M., Metreveli, G., Schaumann, G. et al. (2018). Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environ. Sci. Eur.*, 30(6), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
20. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.*, 12, 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
21. Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Sci. Technol.*, 77, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.022>

22. Reynolds, G. (2007). *FDA recommends nanotechnology research, but not labelling*. FoodProductionDaily.com.  
<https://www.foodnavigator.com/Article/2007/07/26/FDA-recommends-nanotechnology-research-but-not-labeling> [Fecha de acceso 8 marzo 2021].
23. Sorrentino, A., Gogorrasi, & Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bio-nano-composites for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 18(2), 84-95.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.004>
24. Aparicio-García, P., Ventura-Aguilar, R. I., Del Río-García, J. C., Hernández-López, M., Guillén-Sánchez, D., Salazar-Piña, D. et al. (2021). Edible chitosan/propolis coatings and their effect on ripening, development of *Aspergillus fl vus*, and sensory quality in fig fruit, during controlled storage. *Plants*, 10(112), 1-12.  
<https://doi.org/10.3390/plants10010112>
25. Istúriz-Zapata, M. A., Hernández-López, M., Correa-Pacheco, Z. N., & Barrera-Necha, L. L. (2020). Quality of cold-stored cucumber as affected by nanostructured coatings of chitosan with cinnamon essential oil and cinnamaldehyde. *LWT-Food Sci. Technol.* 123(109089), 1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109089>
26. Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Ramos-García, M. L., Martínez-González, M. C., & Hernández-Romano, J. (2019). Physicochemical characterization of and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticles film. *Prog. Org. Coat.*, 137(105326), 1-14.  
<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105326>
27. Correa-Pacheco, Z. N., García-Paniagua, K. D., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2019). Effect of chitosan-thyme essential oil nanocoatings on postharvest quality of tomato fruit. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 37(1), 29-36.
28. González-Saucedo, A., Barrera-Necha, L. L., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Hernández-López, M. (2019). Extension of the postharvest quality of bell pepper by applying nanostructured coatings of chitosan with *Byrsonima crassifolia* extract (L.) Kunth. *Postharvest Biol. Tec.*, 149, 74-82.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.019>
29. Hernández-López, G., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Barrera-Necha, L. (2020). Nanostructured chitosan edible coating loaded with  $\alpha$ -pinene for the preservation of the postharvest quality of *Capsicum annuum* L. and *Alternaria alternata* control. *Int. J. Biol. Macromol.*, 165, 1881-1888.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.094>
30. Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Marquina-Valle, M. A., & Hernández-López, M. (2017). Effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth in vitro and on cv Hass and fruit quality. *J. Phytopathol.*, 165, 297-305.  
<https://doi.org/10.1111/jph.12562>

31. Lara-Cortés, E., Troncoso-Rojas, R., Hernández-López, M., & Bautista-Baños, S. (2016). Evaluación del cinamaldehído en la conservación de dalias comestibles, en condiciones diferentes de almacenamiento. *Rev. Chapingo ser. Horticultura*, 22(3), 177-189.
32. Black-Solís, J., Ventura-Aguilar, R. I., Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, S. (2017). Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 35(2), 204-226.  
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1612-5>
33. Luque-Alcaraz, A., Lizardi, J., Goycoolea, F., Valdez, M., Acosta, A., Iloki-Assanga, S. et al. (2012). Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles. *J. Nanomater.*, 265161, 1-7.  
<https://doi.org/10.1155/2012/265161>
34. Lozano, M., Torrecilla, D., Torres, D., Vidal, A., Domínguez, F., & Alonso, M. (2008). Highly efficient system to deliver taxanes into tumor cells: docetaxel-Loaded chitosan oligomer colloidal carriers. *Biomacromolecules*, 9, 2186–2193.
35. Ramos-García, M., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L. Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I., & Estrada Carrillo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 28, 44-57.
36. Barnes, J., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., & Davison, A. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls “a” and “b” in lichens and higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 32(2), 85-100.  
[https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90034-Y](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90034-Y)
37. Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Herrera-Arellano, A., Zamilpa, A., Jiménez, J. E., Alonso-Cortés, D. et al. (2007). Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *J. Ethnopharmacology*, 109, 35-40.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.013>
38. Sotelo-Boyás, M. E., Bautista-Baños S., Valverde-Aguilar, G., Plascencia-Jatomea, M., Correa, Z. N., Jiménez-Aparicio, A. et al. (2015). Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. *In vitro* effect on *Pectobacterium carotovorum*. *Rev. Mex. Ing. Quím.*, 14(3), 589-599.
39. Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Corona-Rangel, M. L., Villanueva-Arce, R., & Bautista-Baños, S. (2019). Cellular alterations in *Pectobacterium carotovorum* treated with nanostructured formulations during the incubation time. *Arch. Microbiol.*, 201, 615-622.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-019-01628-w>
40. Judefeind, A., & de Villiers, M. (2009). Drug loading into and in vitro release from nano-sized drug delivery systems. En M. de Villiers, P. Aramwit, G. Kwon (Eds.), *Nanotechnology in drug delivery*. Springer, USA.  
[https://doi.org/10.1007/978-0-387-77668-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77668-2_5)



41. Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, A., Bautista-Baños, S., & Gómez y Gómez, Y. (2017). Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.*, 103, 409-414.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.063>
42. Li, J., & Zhuang, S. (2020). Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *Eur. Polym. J.*, 138(109984), 1-12.  
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109984>
43. Liew, S. N., Utra, U., Alias, A. K., Tan, T. B., Tan, C. P., & Yussof, N. S. (2020). Physical, morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method. *LWT-Food Sci. Technol.*, 128(109388), 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109388>
44. Elsabee, M., & Abdou, E. (2013). Chitosan based edible films and coatings: a review. *Mater. Sci. Eng. C*, 33, 1819-1841.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
45. Zhang, H., Jung, J., & Zhao, Y. (2016). Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catechins and catechins-Zn complex loaded-chitosan nanoparticles of different particle sizes. *Carbohydr. Polym.*, 137, 82-91.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.036>
46. Barrera-Necha, L. L., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Martínez Jiménez J. E., & Morán Mejía, A. (2016). Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles loaded botanical extracts with antifungal activity on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria* species. *Adv. Microbiol.*, 8, 286-296.
47. Abdel-Aliem, H., Gibriel, A., Rasmy, N., Sahab, A., El-Nekeety, A., & Abdel-Wahhab, M. (2019). Antifungal efficacy of chitosan nanoparticles against phytopathogenic fungi and inhibition on zearaleone production by *Fusarium graminearum*. *Com. Sci.*, 10(3), 338-345.  
<https://doi.org/10.14295/cs.v10i3.1899>
48. Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., & Bosquez-Molina, E. (2004). Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 22(2), 178-186.
49. Chookhongka, N., Sopondilok, T., & Photchanachai, S. (2013). Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and chilli seed quality. *Acta Hort.*, 973, 231-237.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.973.32>
50. Zahid, N., Alderson, P., Ali, A., Maqbool, M., & Manickam, S. (2013). *In Vitro* control of *Colletotrichum gloeosporioides* by using chitosan loaded nanoemulsions. *Acta Hort.*, 1012, 769-774.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1012.104>

51. Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., & Marquina-Valle, M. A. (2018). Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 36(3), 457-467.  
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1803-2>
52. García, F., & Davidov-Pardo, G. (2021). Recent advances in the use of edible coatings for preservation of avocados: A review. *J. Food Sci.*, 86(1), 6-15.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15540>
53. Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biol. Technol.*, 41, 164-171.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.03.016>
54. Martínez-González, M. C., Bautista-Baños, S., Correa-Pacheco, Z. N., Corona-Rangel, M. L., Ventura-Aguilar, R. I., Del Río-García, J. C. et al. (2020). Effect of nanostructured chitosan/propolis coatings on the quality and antioxidant capacity of strawberries during storage. *Coatings*, 10(90), 1-12.  
<https://doi.org/10.3390/coatings10020090>
55. Costantini, R., Ventura-Aguilar, R. I., Hernández-López, M., Bautista-Baños, S., & Barrera-Necha, L. L. (2018). Potencial antifúngico in vitro e in situ de nanopartículas de quitosano y extracto de arándano sobre *Colletotrichum fragariae* en fresa. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 19(1), 1-12.
56. Luque-Alcaraz, A. G., Cortez-Rocha, M. O., Velazquez-Contreras, C. A., Acosta-Silva, A. L., Santacruz-Ortega, H. del C., Burgos-Hernandez, A. et al. (2016). Enhanced Antifungal Effect of Chitosan/Pepper Tree (*Schinus molle*) Essential Oil Bionanocomposites on the Viability of *Aspergillus parasiticus* Spores. *J. Nanomater.*, 2016(6060137), 1-10.  
<https://doi.org/10.1155/2016/6060137>