



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO-TIMOL MEDIANTE EL MÉTODO PULVERIZACIÓN-CONGELACIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO, EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A MICELIO DE *BOTRYTIS CINEREA* Y COMPARACIÓN CON NANOPARTÍCULAS OBTENIDAS POR GELIFICACIÓN IÓNICA.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN ALIMENTOS

DANIEL ALEJANDRO SALGADO RAMÍREZ

Patrocinante:

Dra. Lilian Elizabeth Abugoch James

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química.

Director de Tesis:

Dr. Cristián Adolfo Tapia Villanueva

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química.

Co-Director de Tesis:

Dra. Lilian Elizabeth Abugoch James

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química.

Santiago, Chile 2019

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Nanopartículas incorporadas a envases y películas	12
1.2 Método de gelificación iónica en la elaboración de nanopartículas	13
1.3 Método de spray freeze-drying en la elaboración de nanopartículas	14
1.4 <i>Botrytis cinerea</i>	16
1.5 Timol	19
1.6 Quitosano.....	20
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
2.1 Hipótesis	22
2.2 Objetivo General	22
2.3 Objetivos Específicos	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Materiales.....	23
3.2 Metodología.....	24
3.2.1 Elaboración de suspensión de nanopartículas.....	24
3.2.1.1 <i>Por el método de gelificación iónica</i>	24

3.2.1.2 Por el método de pulverización congelación en nitrógeno líquido	24
3.2.2 Elaboración de solución control	27
3.2.3 Determinación contenido de timol.....	27
3.2.4 Determinación de eficiencia de encapsulación y capacidad de carga.....	27
3.2.4.1 Eficiencia de encapsulación (EE%)	27
3.2.4.2 Capacidad de carga (CC%).....	28
3.2.4.3 Rendimiento de Nanopartícula (RnP%).....	28
3.2.5 Propiedades fisicoquímicas de nanopartículas	28
3.2.5.1 Determinación del tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad	28
3.2.5.2 Evaluación de estabilidad de nanopartículas en el tiempo	28
3.2.6 Ensayos de liberación de timol desde nanopartículas.....	29
3.2.7 Evaluación de actividad antifúngica frente a micelio de <i>Botrytis cinerea</i>	29
3.2.7.1 Preparación de inóculos de <i>Botrytis cinerea</i>	29
3.2.7.2 Inhibición de micelio	30
3.2.8 Análisis Estadístico.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
4.1 Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersión y potencial Z en nanopartículas de quitosano y quitosano/timol	32
4.2 Estabilidad del diámetro hidrodinámico y potencial Z en nanopartículas de quitosano y quitosano/timol.	37
4.3 Rendimiento, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación	38
4.4. Acción inhibitoria de nanopartículas quitosano y quitosano/timol enfrentadas a micelio de <i>Botrytis cinerea</i>	41
4.5. Perfil de liberación de activo desde nanopartículas.	44
5. CONCLUSIONES	47
6. REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Concentraciones de quitosano y timol (mg/mL) utilizadas en el ensayo antifúngico para los tratamientos NPs-Q-GI, NPs-QT-GI, NPs-Q-SFD-NPs-QT-SFD, QT, en diluciones al 10, 25 y 50% (v/v).	30
Tabla 2.	Diámetro Hidrodinámico, Índice de Polidispersidad y Potencial-Z en nanopartículas de quitosano y quitosano-timol elaboradas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido.	32
Tabla 3.	Diámetro hidrodinámico y potencial Z de nanopartículas quitosano-timol por SFD y GI, almacenadas durante 6 semanas a 4°C.	37
Tabla 4.	Rendimiento en partículas (RP%), capacidad de carga (CC%) y eficiencia de encapsulación (EE%) en nanopartículas de quitosano-timol elaboradas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido.	38
Tabla 5.	Valores calculados para el exponente de liberación (n), la constante cinética (k) y el coeficiente de Pearson (r^2) en nanopartículas por gelificación iónica y por atomización-congelación en nitrógeno líquido	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Interacción iónica y entrecruzamiento del quitosano y tripolifosfato de sodio.	14
Figura 2.	Morfología de <i>Botrytis cinerea</i> , racimos de conidios (izquierda) y conidio germinando en la superficie de un pétalo de rosa (derecha)	18
Figura 3.	Esquema del proceso de fabricación de nanopartículas por SFD	26
Figura 4.	Esquema del proceso de aplicación de ultrasonido a suspensión de nanopartículas por SFD.	26
Figura 5.	Desarrollo micelar porcentual de <i>Botrytis cinerea</i> respecto al control de viabilidad para los 5 tratamientos utilizados. (*) Indica ausencia de crecimiento del hongo con tratamiento indicado.	42
Figura 6.	Porcentaje de masa de timol liberada por nanopartículas quitosano-timol elaboradas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido durante 7 días.	44

INDICE DE ABREVIATURAS

°C	: Grados Celsius
μL	: Microlitro
CC	: Capacidad de carga de activo en la nanopartícula
CEO	: Aceite esencial de Carum copticum
CIM	: Concentración inhibitoria mínima
cm²	: Centímetro cuadrado
DLS	: Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering en inglés)
EE	: Eficiencia de encapsulación de activo en la nanopartícula
gL⁻¹	: Gramos en un litro
GI	: Gelificación iónica
kDa	: Kilodalton
mg	: Miligramos
min	: Minutos
mL	: Mililitros
mm	: Milímetros
mmHg	: Milímetro de mercurio
mV	: Milivoltios
N/U	: Sin tratamiento de ultrasonido
nm	: Nanómetro
NPs	: Nanopartículas
p/p %	: Porcentaje peso-peso
p/v %	: Porcentaje peso-volumen.
PDI	: Índice de polidispersidad
PM	: Peso molecular
ppm	: Partes por millón

Q : Quitosano

QLMW: Quitosano de bajo peso molecular

QT : Quitosano Timol

RP : Rendimiento en partículas

SFD : Spray Freeze Drying (pulverización - congelación en nitrógeno)

seg : Segundos

SFV : Pulverización - congelación en vapor

SFL : Pulverización - congelación en líquido

SFL/V : Pulverización - congelación en vapor sobre líquido

T : Timol

TPP : Tripolifosfato de Sodio

v/v % : Porcentaje volumen volumen

Z-ave : Zeta average (diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas)

Z-pot : Potencial zeta de nanopartículas.

ABSTRACT

This study aimed to the manufacture of polymeric nanoparticles using chitosan as encapsulating material to retain thymol by two procedures: spray-freezing in liquid nitrogen and ionic gelation, with which to evaluate and compare its antifungal capacity against mycelium of *Botrytis cinerea*.

The determination of the thymol content is carried out by high performance liquid chromatography, the particle size, potential Z and polydispersity index was measured by the Zetasizer Nano ZS-90 equipment, for the determination of the antifungal activity the Yildirim and Yapici method is used.

The hydrodynamic size, Z-potential and polydispersity index of nanoparticles obtained by both methods was similar between the two methods mentioned above (Z average = 287-289 nm. PDI= 0,37 - 0,41). The Zeta Potential was higher for nanoparticles obtained by ionic gelation (47,4 mV) respect to the SFD (22,1 mV). The aqueous Nano suspension for both procedures was stable in the parameters indicated above, at least 6 weeks stored at refrigeration temperature (4°C).

Better encapsulation parameters were obtained for GI (load capacity (CC%) 5,56%; encapsulation efficiency (EE%) 56,5% and particle yield (RnP%) 72,8%), compared to SFD (CC% 4,73%; EE% 37,5%; RP% 42,5%).

The antifungal effect of both types of nanoparticles was measured against mycelium of *Botrytis cinerea*, both inhibiting the 100% in 25 and 50% dilutions. At lower concentrations (10% those obtained by GI had a greater inhibitory effect than those obtained by SFD. The greatest success in the inhibition of *Botrytis cinerea* by GI is due to the higher thymol release rate within the first 48 hours in front of its pair, studied in an aqueous medium at 25°C.

Based on the differences in the rate of release studied for both methods, it allows us to choose, depending on the objective of the active principle used, a rapid release method (GI) and a slower release method (SFD) which could contribute to the development of applications in various areas of interest, beyond that outlined in this study.

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo la fabricación de nanopartículas poliméricas usando como material encapsulante quitosano para retener timol mediante dos procedimientos: pulverización-congelación en nitrógeno líquido y gelificación iónica, con las cuales evaluar y comparar su capacidad antifúngica frente a micelio de *Botrytis cinerea*. La determinación de contenido de timol se efectuó mediante cromatografía líquida de alta eficacia, el tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad se midió mediante el equipo Zetasizer Nano ZS-90, para la determinación de la actividad antifúngica se utilizó el método de Yildirim y Yapici. El tamaño hidrodinámico, potencial Z e índice de polidispersidad de nanopartículas obtenidas por ambos métodos fue similar entre ambos métodos anteriormente señalados (Zaverage = 287-289 nm, PDI = 0,37-0,41). El potencial zeta fue mayor para las nanopartículas obtenidas mediante gelificación iónica (47, 4 mV) respecto al procedimiento de pulverización-congelación en nitrógeno líquido (22,1 mV). La nanosuspensión acuosa para ambos procedimientos fue estable en los parámetros señalados anteriormente, al menos 6 semanas almacenada a temperatura de refrigeración (4°C). Se obtuvieron mejores parámetros de encapsulación para GI (capacidad de carga (CC%) 5,56%; eficiencia de encapsulación (EE%) 56,5 %; y rendimiento en partículas (RP%) 72,8%) comparado con SFD (CC% 4,73%; EE% 37,5%; RnP% 42,5%). Se midió el efecto antifúngico de ambos tipos de nanopartículas frente a micelio de *Botrytis cinerea*, ambas inhibieron al 100% en diluciones al 25 y 50%. En concentraciones más bajas (10%) las obtenidas por GI tuvieron un mayor efecto inhibitorio que las obtenidas por SFD. El mayor éxito en la inhibición de *Botrytis cinerea* por parte de GI se debió a la mayor velocidad de liberación de timol dentro de las primeras 48 horas frente a su par, estudiadas en medio acuoso a 25°C.

A partir de las diferencias en la velocidad de liberación del principio activo estudiadas para ambos métodos, nos permite escoger, dependiendo del objetivo del activo utilizado, un método de liberación rápida (GI) y un método de liberación más lenta (SFD), lo cual puede contribuir al desarrollo de aplicaciones en diversas áreas de interés, más allá de la expuesta en este estudio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanopartículas incorporadas a envases y películas.

La nanotecnología ha logrado un importante crecimiento desde la década de los 80's y ha sido aprovechada y adaptada dentro de múltiples campos, como son la electrónica, mecánica, biomedicina, ingeniería espacial e ingeniería en alimentos (Dwivedi y cols., 2015). En el área de la ciencia y tecnología de alimentos ha surgido el concepto de envase activo, el cual incluye el uso de aditivos en forma de nanopartículas capaces de difundir e interactuar con el alimento, incrementando la funcionalidad del empaque, otorgando mejor resistencia a la oxidación y deterioro por acción microbiológica, aumentando la retención de aromas y sabores mientras conserva la calidad e inocuidad del producto (Ramos y cols., 2017). La incorporación de nanopartículas en envases también ha resultado en la mejora de algunas propiedades clave dentro del material de empaque, como lo son la flexibilidad, resistencia mecánica, propiedades de barrera, estabilidad a la humedad, al frío y al calor. (Abugoch y cols., 2011., Cushen y cols., 2012., Caro y cols., 2016).

Se ha estudiado el uso de recubrimientos comestibles de quitosano/proteína de quínoa como envases activos que incorporan nanopartículas antimicrobianas de quitosano/timol sobre tomate cherry, arándano y frutilla, mostrando una significativa reducción en el recuento de hongos y levaduras, siendo también capaces de disminuir hasta en un 60% la tasa de emisión de CO₂, sin afectar significativamente la calidad sensorial del producto (Valenzuela y cols., 2013., Medina y cols., 2019., Díaz, 2015., Nobeta, 2014).

En la literatura han sido reportados variados métodos para la elaboración de nanopartículas de quitosano. La selección de cualquiera de estos métodos depende de factores como el requerimiento de tamaño de partícula, estabilidad química y térmica del agente activo, reproductibilidad del perfil cinético de liberación, estabilidad del producto final y toxicidad residual (Agnihotri y cols., 2004). Algunos

métodos reportados en la literatura son 1) Coacervación/precipitación, 2) Gelificación Iónica, 3) Atomización-congelación en nitrógeno líquido, entre otros (Agnihotri, 2004 y cols., Gamboa y cols., 2015).

1.2 Gelificación Iónica en la elaboración de nanopartículas

La gelificación iónica es un método en el cual un polisacárido, como alginato, pectina o quitosano, disuelto en agua o en un medio ácido, se añade por goteo bajo constante agitación, a una solución que contiene un contraión, como CaCl_2 , BaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , tripolifosfato de sodio (TPP) u otros. Debido a la complejación entre especies de cargas opuestas, el polisacárido sufre una gelificación iónica y precipita formando partículas esféricas (Racovita y cols., 2009). Este método ampliamente estudiado es ventajoso, respecto a otros, porque evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos. También, en el caso de quitosano, su naturaleza policationica le confiere la capacidad de asociar compuestos bioactivos en forma eficiente y preservar su estabilidad y bioactividad frente al medio externo (Goycoolea y cols., 2009)

La formación de nanopartículas de quitosano/TPP mediante gelificación ionotrópica ocurre por la interacción electrostática entre los productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ y $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$), con los grupos $-\text{NH}_3^+$ del quitosano. Se reportan tamaños de partícula en un rango de entre 100 y 350 nm y una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopía de transmisión electrónica y de fuerza atómica. (Goycoolea y cols., 2009., Caro, 2015, Gan y cols., 2005).

Diversos compuestos han logrado ser encapsulados mediante este método, entre ellos figuran agentes antidiabéticos, drogas antiinflamatorias, antibióticos, proteínas y enzimas, probióticos, metales, antioxidantes, aceites esenciales (Racovita y cols., 2009)

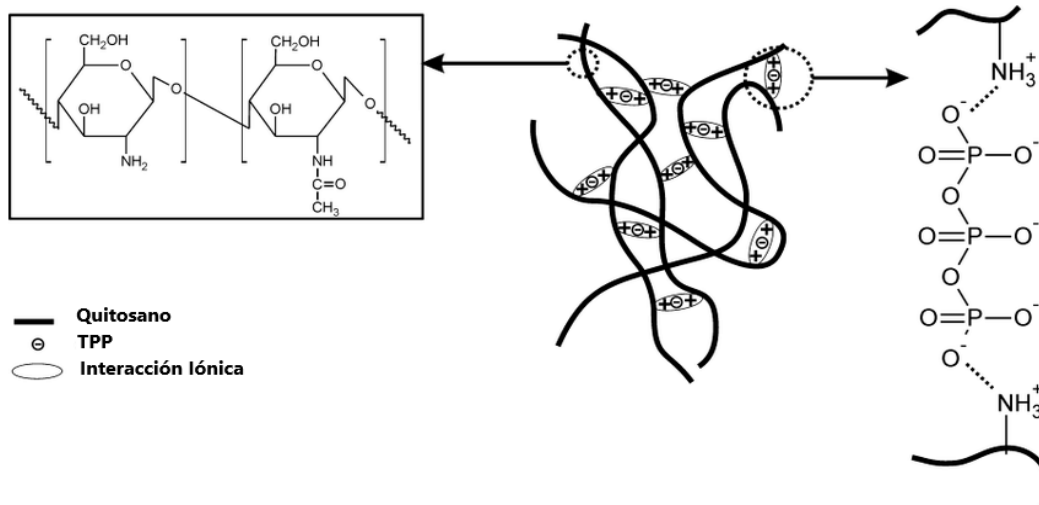


Fig.1: Interacción iónica y entrecruzamiento del quitosano y tripolifosfato de sodio.

1.3 Spray freeze-drying en la elaboración de nanopartículas

El “Spray Freeze-Drying” o pulverización-congelación en nitrógeno es una técnica poco convencional que genera productos exclusivamente en polvo. Se utiliza en productos de alto valor debido a sus ventajas sobre otras técnicas de secado (como el secado por aspersión) en términos de estructura de producto, calidad y retención de compuestos bioactivos (Padma y Anandharamakrishnan, 2015). Durante este proceso, la solución de alimentación atraviesa tres etapas de transformación:

- i. Atomización
- ii. Congelación
- iii. Secado en Frío

Así, se puede definir como un proceso de tres pasos que involucra una solución siendo atomizada en gotitas, solidificada por contacto con un fluido frío, seguido de una sublimación a baja temperatura y presión (Leuenberger, 2002)

- i. *Atomización:* consiste en pulverizar la solución o suspensión alimentadora. Las gotitas resultantes de la solución ofrecen un campo de temperatura más homogéneo para la transferencia de calor durante la

etapa de enfriamiento, lo que conlleva a una nucleación uniforme y formación de cristales de hielo finos (MacLeod y cols., 2006), la dimensión reducida de la muestra también resulta en el aumento de la velocidad de sublimación y del coeficiente de transferencia de masa superficial durante las etapas de congelación y liofilización. Se suelen utilizar boquillas hidráulicas, mecánicas y ultrasónicas para la atomización. Las variables clave que determinan el tamaño final de la gota son el diámetro interno de la boquilla, la viscosidad de la solución a atomizar, el flujo y la presión (Anandharamakrishnan, 2017).

- ii. *Congelación*: durante esta etapa las gotitas son sometidas a un rápido enfriamiento hasta la congelación por el contacto con un criógeno, lo cual restringe la circulación de los componentes al interior de la partícula (Rogers y cols., 2008). El nitrógeno líquido es el criógeno más comúnmente empleado debido a su bajo punto de ebullición de -196°C ., también se utilizan otros como isopentano, argón, hidrofuroeter, sin embargo, el nitrógeno líquido tiende a evaporarse más fácilmente. Basado en el estado físico del criógeno utilizado para el proceso, el SFD puede ser clasificado dentro de tres tipos: Atomización-congelación en Vapor (SFV): en la cual se pulveriza la solución en un vapor de gas seco frío, Atomización-congelación en Líquido (SFL): donde la solución es pulverizada dentro de un líquido criogénico y finalmente, Atomización-congelación en Vapor sobre Líquido (SFV/L): donde la muestra es pulverizada en un líquido criogénico pero la atomización ocurre en la región de espacio de cabeza gaseosa sobre el líquido (Anandharamakrishnan, 2017).
- iii. *Secado en Frío*: Las partículas congeladas son recolectadas luego de la evaporación del líquido criogénico y son sometidas a un proceso de sublimación para remover el agua de las partículas. El agua por tanto, pasa directamente de estado sólido a vapor sin pasar por el estado

líquido, para lo cual se debe trabajar por debajo del punto triple del agua, 0,01°C y 4,5 mmHg (Mumenthaler y Leuenberger, 1991). La limitación de este proceso es el uso intensivo de energía para el uso del vacío y el modo de operación por lotes, lo que conduce a un alto costo operacional (Di Matteo y cols., 2003).

El método SFD ha sido utilizado principalmente en productos alimenticios como lácteos, café instantáneo, jugo de manzana en polvo y formulaciones en base a proteínas. También se ha establecido para la encapsulación de bacterias probióticas y compuestos nutraceuticos bioactivos entre otros (Rajam y Anandharamakrishnan, 2015).

Nobeta (2014) desarrolló el protocolo para la adaptación de este método en la fabricación de nanopartículas de quitosano-timol destinadas al aumento de la vida útil en berries mediante su incorporación en películas comestibles. Díaz (2015) modificó el método añadiendo agentes crioprotectores y un post tratamiento de ultrasonido intenso para reducir el tamaño de partícula.

1.4 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es un hongo patógeno de las plantas, transportado por el aire con un estilo de vida necrotrófico, ubicuo, que ataca sobre 200 tipos de cultivos en todo el mundo. Aunque existen múltiples fungicidas para su control, varias clases han fallado debido a su plasticidad genética lo que lo ha convertido en un importante modelo para estudios moleculares en hongos necrotróficos (Williamson y cols., 2007; Latorre y cols., 2015).

Es más destructiva en tejidos maduros o senescentes de huéspedes dicotiledóneos, pero usualmente consigue la entrada a tales tejidos en etapas tempranas en el desarrollo del cultivo y permanece quieto por un período considerable antes de

podrir los tejidos cuando el ambiente es propicio y la fisiología del huésped cambia (Williamson y cols., 2007).

Las estructuras fúngicas latentes o metabólicamente inactivas juegan un rol central en los ciclos de enfermedad, cada parte del talo del hongo puede servir como una estructura de supervivencia (Elad y cols., 2007).

Esclerocio: Es la estructura más importante involucrada en la supervivencia de todas las especies de *Botrytis*. Puede resistir condiciones ambientales adversas, puede producir apotecia después de un proceso sexual y posee una considerable capacidad para producir sucesivos cultivos de conidios (Coley-smith y cols., 1987; Elad y cols., 2007). En condiciones naturales, se puede esperar que gotas de lluvia desliguen los conidios desde el esclerocio germinador e iniciar un nuevo ciclo de producción conidial.

Conidios: son considerados propágulos de corta vida en el campo, y su supervivencia es principalmente determinada por la temperatura, disponibilidad de humedad, actividad microbiana y exposición al sol. Los conidios se mueven por corrientes de aire a cultivos vecinos y son capaces de sobrevivir en superficies de frutas o en sitios vegetales donde obtengan nutrientes necesarios para su desarrollo, sin embargo, en el suelo no son particularmente competidores efectivos y pueden desaparecer. Se ha reportado que conidios almacenados en seco a temperatura ambiente son capaces de sobrevivir hasta por 14 meses. Son el inóculo primario durante la floración y maduración, durante la primavera siempre hay una abundante y constante disponibilidad de conidios en el aire (Latorre y cols., 2015)

Micelio: La supervivencia del micelio de *Botrytis* bajo condiciones naturales ha sido escasamente investigada, y es difícil en práctica decidir cuando la supervivencia es afectada por vía micelio, por esclerocio o clamidosporas. Hay evidencia de que el micelio puede sobrevivir por considerables periodos en bulbos, semillas y otras partes de plantas. (Elad y cols., 2007)

Clamidosporas: son células translúcidas de tamaño y forma variable. Se encuentran generalmente en cultivos envejecidos y comúnmente aparecen en el estroma de

cultivos del hongo el cual es contaminado por otro organismo. Son formadas como células por transformación de micelio vegetativo y liberadas por desintegración de la hifa. Su función es servir como estructura de supervivencia por periodos cortos, que ayudan al hongo a superar periodos desfavorables en la superficie de plantas. (Latorre y cols., 2015; Elad y cols., 2007)

B. cinerea puede infectar berries durante el desarrollo estacional, se requiere humedad y temperatura para que ocurra la infección, Bajo estas condiciones, los conidios germinan después de la deposición, hidratación y fijación a la superficie del huésped (Cotoras y Silva, 2005) formando un tubo germinal único o ramificado, a menudo con una hifa aplanada “appressorium” en el extremo distal. Esta hifa facilita la fijación en la superficie del huésped y penetración de un complejo proceso enzimático. La penetración pasiva o indirecta puede ocurrir a través de aberturas naturales (estomas y lenticelas) y heridas en el fruto. En Chile, representa una fuerte amenaza para los agricultores, siendo la uva de mesa una de las más perjudicadas por la acción del hongo, el cual puede provocar pérdidas de hasta un 40% de la producción.



Fig 2. Morfología de *Botrytis cinerea*, racimos de conidios (izquierda) y conidio germinando en la superficie de un pétalo de rosa (derecha) (Williamson y cols, 2007)

1.5 Timol

El timol (o isopropil-metacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol) ha sido reportado como uno de los agentes antimicrobianos más activos dentro de los constituyentes presentes en los aceites esenciales. Se encuentra principalmente en el aceite esencial de tomillo, orégano y en otras fuentes como los aceites de mandarina y tangerina (Falcone y cols., 2005). La FDA considera al timol como aditivo alimentario, mientras que la FAO/WHO lo declara como no nocivo para la salud cuando se usa como agente saborizante (máximo 50 mg/kg). (Falcone y cols., 2005., Abbaszadeh y cols., 2014). Ha sido estudiada su actividad antifúngica mostrando una significativa reducción en el crecimiento de *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae* y *Botrytis cinerea*. Los resultados indican que la MIC del timol se encuentra en un rango que va desde los 100-500 mg/mL para las diferentes especies de hongos (Marchese y cols., 2016).

La naturaleza hidrofóbica de los terpenoides fenólicos facilita que se ubique al interior de membranas lipídicas, modifique la estructura de barrera y por ende altera la permeabilidad y osmolaridad, lo que gatilla una rápida e irreversible salida de componentes celulares (Skandamis y Nychas, 2001). Principalmente se ve afectada la homeostasis de Ca^{+2} y H^{+} en levaduras conduciendo rápidamente a la pérdida de viabilidad celular (Rao y cols., 2010).

Por otro lado, el timol también funciona como un potente inhibidor de la enzima pectin metil esterasa (PME), esta enzima modifica los grados de metil esterificación de pectinas, la cual es un componente importante en la pared celular de hongos. Dichos cambios en la estructura de la pectina son asociados con cambios en adhesión celular, plasticidad, pH y contenido iónico de la pared celular e influye en el desarrollo, integridad y permeabilidad de la membrana (Marei y cols., 2012).

1.6 Quitosano

El quitosano (Q) es un polisacárido policatiónico natural obtenido de la quitina, la cual es un polisacárido de origen animal encontrado abundantemente en la naturaleza y caracterizado por una estructura fibrosa (Kausar, 2016). Es el principal constituyente del exoesqueleto de insectos y crustáceos como el camarón, el cangrejo y la langosta. Su estructura puede ser modificada mediante la remoción de los grupos acetilo, los cuales se unen a radicales amino en la posición C2 sobre el anillo de glucano, por medio de una hidrólisis química en solución alcalina concentrada a temperatura elevada para producir una forma desacetilada. Cuando la fracción del grupo amino acetilado es reducida al 40-35%, el co-polímero resultante, (1 → 4)-2-amino-2-desoxi-β-D-glucano y (1 → 4)-2-acetamida-2-desoxi-β-D-glucano, se denomina quitosano (Goy y cols., 2009).

Se subdivide a partir de su peso molecular en tres tipos, quitosano de bajo peso molecular de menos de 150 kDa, quitosano de alto peso molecular de 700-1000 kDa, y quitosano de peso molecular medio (Mishra, 2015)

El quitosano tiene probada actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus oryzae*, *Phomopsis asparagi*, *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*. Su actividad depende principalmente de su peso molecular, grado de desacetilación, y concentración. Su actividad antifúngica está dada por su carácter de poliacación (Yien y cols., 2012). Por otro lado se ha demostrado que la aplicación de quitosano en forma nanoparticulada presenta mayor actividad antifúngica respecto a cuándo se aplica en forma de solución (Qi y cols., 2004., Yien y cols., 2012).

Para comprobar su acción, estudios realizados en *S.cerevisiae* demostraron que el quitosano interfiere primariamente en la síntesis de proteínas en levaduras, siendo la interrupción de este proceso fundamental, el causante de diversos efectos adicionales por parte del quitosano, que involucran el tráfico celular, secreción y progresión del ciclo celular (Galván y cols., 2013).

Otros mecanismos propuestos sugieren que la membrana plasmática es el objetivo principal del quitosano, la carga positiva lo capacita para interactuar con los componentes fosfolípidos cargados negativamente de la membrana del hongo. Este hecho incrementa la permeabilidad de la membrana y causa la filtración del contenido celular, lo que conlleva a la muerte celular (Yien y cols., 2012). También se ha reportado que el Q puede inhibir completamente la actividad enzimática de la hexoquinasa de *Botrytis*, bloqueando el primer paso de la metabolización de la glucosa (Rui y Hahn, 2007).

Medina y cols (2019), estudiaron la aplicación de recubrimientos de quitosano/proteína de quínoa cargados con nanopartículas de quitosano/timol en arándanos y tomate cherry, elaboradas mediante gelificación iónica, observando una efectiva inhibición del micelio de *Botrytis*.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La aplicación de un tratamiento de ultrasonido sobre las nanopartículas obtenidas por pulverización-congelación en nitrógeno permitirá reducir su tamaño y disminuir la polidispersidad porque la cavitación desagregará las nanopartículas, y a su vez estas nanopartículas tendrán un mayor efecto antifúngico sobre el micelio de *Botrytis cinerea* respecto a nanopartículas elaboradas por gelificación iónica, ya que tendrán una mayor área superficial, mayor disponibilidad de grupos amino protonados y por ende mayor bioactividad.

2.2 Objetivo General

Elaborar nanopartículas de quitosano y quitosano/timol fabricadas por pulverización-congelación en nitrógeno líquido con un post tratamiento de ultrasonido y comparar su efecto antifúngico con nanopartículas de quitosano y quitosano/timol elaboradas por gelificación iónica.

2.3 Objetivos Específicos

- Elaborar y caracterizar nanopartículas por el método pulverización-congelación en nitrógeno.
- Elaborar y caracterizar nanopartículas por el método de gelificación iónica.
- Estudiar el efecto inhibitorio de micelio de *Botrytis cinerea* por parte de ambos tipos de nanopartículas y una solución de quitosano/timol.
- Determinar el perfil de liberación de timol desde nanopartículas elaboradas por ambos métodos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

- Quitosano de Bajo Peso Molecular: Sigma-Aldrich. N° Producto: 448869. 75-85% desacetilación, 50-190 kDa (basado en viscosidad)
- Ácido acético (glacial) 100%. Masa molar: 60,05 g/mol. N° 200-580-7
- Cepa de *Botrytis cinerea wt* aislado desde vides Red Globe proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de Chile.
- Timol: Sigma-Aldrich. N° de producto: T0501-100g. ≥99,5%. Peso molecular: 150,22. Presión de vapor: 1mm Hg (64°C). Punto de ebullición 232°C. Punto de fusión 48-51°C. Densidad 0,965 g/ml a 25°C
- Pluronic F-127, Sigma-Aldrich, P2443.
- Terbutanol, Merck. N° 605-005-00-1
- Nitrógeno líquido, Clean Ice S.A
- Tripolifosfato de Sodio (TPP), Sigma-Aldrich.
- Agar Papa Dextrosa, 500 g, Dibico.

3.2 Metodología

3.2.1 *Elaboración de suspensión de nanopartículas*

3.2.1.1 *Por el método de gelificación iónica (NPs-QT-GI):*

Basado en el método de Calvo y cols., (1997) con modificaciones. Se preparó una solución acuosa de timol al 0,1% (p/v) y quitosano de bajo peso molecular al 0,3% (p/v) en ácido acético 1% (p/v). La solución se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se filtró. De forma paralela, se elaboró una solución de tripolifosfato sódico al 0,1% (p/v).

Se mezcló la solución de quitosano/timol con la de TPP en una relación de 2:1 mediante goteo (1,8 mL/min) por medio de una bomba de infusión en agitación constante. La dispersión obtenida se centrifugó a 21.000 x g a 14°C por 30 min y se conservó el sobrenadante.

Siguiendo la misma metodología se preparó una segunda solución, sin la incorporación de timol en la mezcla (NPs-Q-GI).

3.2.1.2 *Por el método de pulverización-congelación en nitrógeno líquido (NPs-QT-SFD):*

Siguiendo una metodología adaptada de Nobeta (2014) y Díaz (2015). Se elaboró una solución de quitosano de bajo peso molecular al 0,3% (p/v) en ácido acético al 1% (p/v). Se mantuvo con agitación 24 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añadieron 50 mg de Pluronic F-127 por cada 90 mL de la solución de quitosano, se mezcló con agitación magnética a temperatura ambiente durante 20 min. Paralelamente, se disolvieron 50 mg de timol en 10 ml de terbutanol, posteriormente se mezclaron ambas soluciones (quitosano/timol = 9/1 v/v) mediante agitación magnética por 30 min a temperatura ambiente.

Se elaboró una segunda solución siguiendo la misma metodología, sin la incorporación de timol en terbutanol (NPs-Q-SFD).

Las soluciones se pulverizaron por medio de una bomba HPLC Waters Modelo M510, manteniendo una presión de 3000 psi y velocidad de flujo 7,0 mL/min. La bomba se conectó a una manguera PEEK achatada en un extremo para producir la aspersión de la solución. Como líquido criogénico se utilizó nitrógeno líquido (-195°C) en volúmenes de 200 mL por lote. Para evitar la rápida evaporación del nitrógeno se utilizó un receptor de vidrio con tapa, envuelto por una camisa de refrigeración a -15°C. Se mantuvo constante agitación magnética en el líquido criogénico, vórtex 2-4 cm altura (Ver Fig.3).

Una vez pulverizadas las soluciones, se extrajo el polvo en placas Petri y se mantuvieron congeladas a -20°C, posteriormente fueron liofilizadas al vacío durante 48 h a -55°C y 0,05 Torr de presión. Posterior a la liofilización, se procedió a moler la muestra en mortero de cerámica para luego almacenarla a 4 °C.

Las Nps liofilizadas fueron suspendidas en agua destilada en una concentración de 1 mg/mL, con agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se sometieron a tratamiento con ultrasonido en el equipo Q500 Sonicator (500 watts de potencia, 20 kHz de frecuencia) por un periodo de 5 min, a una amplitud de onda del 40%, con pulsaciones ON/OFF cada 30 seg, a temperatura máxima de 30°C (ver fig.4). Para evitar el alza de la temperatura en la suspensión se dispuso de una camisa de refrigeración compuesta por una mezcla criogénica a -18°C y se utilizó un sensor de temperatura para el corte automático del proceso al alcanzar los 30°C.

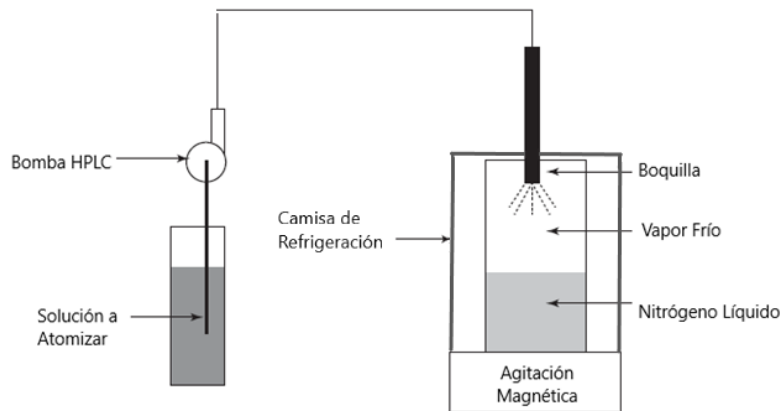


Fig. 3: Esquema del proceso de fabricación de nanopartículas por SFD (Anandharamakrishnan, 2017).

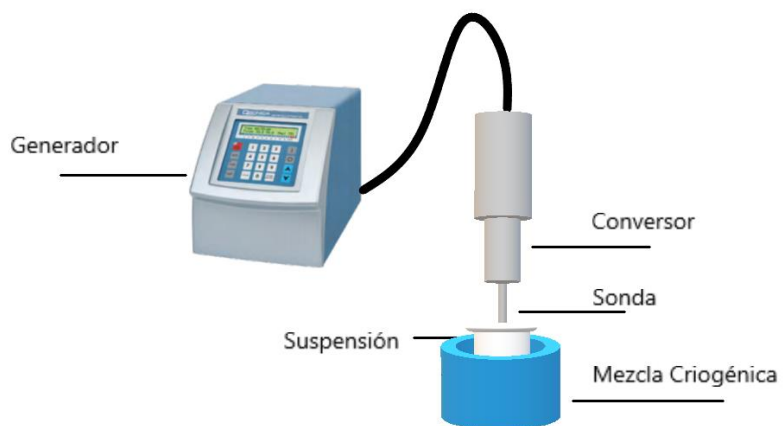


Fig. 4: Esquema del proceso de aplicación de ultrasonido a la suspensión de nanopartículas elaboradas por SFD.

3.2.2 Elaboración de solución control (QT)

Se preparó una solución acuosa de timol al 0,06% (p/v) y quitosano de bajo peso molecular al 0,3% (p/v) en ácido acético 1% (p/v). La solución se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y finalmente se filtró.

Todas las soluciones fueron almacenadas en frascos de vidrio de tapa rosca de 500 mL y refrigeradas (4°C) hasta su utilización.

3.2.3 Determinación de contenido de timol

El contenido de timol de las nanopartículas se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia usando un detector UV a 220 nm, una columna: Symmetry C18. 150 mm x 3,9 mm, tamaño de poro 100Å, 5 µm (Waters, Milford MA, USA). Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo-ácido acético (1%) en una relación de 70/30 respectivamente. Se tomó de forma individual una alícuota de 1 mL de ambas soluciones de nanopartículas con timol (Nps-QT-GI y Nps-QT-SFD con ultrasonido), cada una se mezcló en 8 mL de HCl 0,1 N y se sonicaron por 30 min, se llevaron a un volumen final de 10 ml y se filtraron por membrana de PVDF de 0,22 µm Durapore, Millipore, USA. Se realizaron mediciones por triplicado para cada muestra.

3.2.4 Parámetros de encapsulación de timol y rendimiento en nanopartículas

3.2.4.1 Eficiencia de encapsulación (EE%):

$$EE\% = \left(\frac{\text{masa de timol en nanopartículas}}{\text{masa de timol usada en la reacción}} \right) * 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

3.2.4.2 Capacidad de Carga (CC%):

$$CC\% = (\text{masa de timol en nanopartículas} / \text{masa de nanopartículas}) * 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

3.2.4.3 Rendimiento en nanopartículas (RnP%)

$$RnP\% = (\text{masa de nanopartículas} / \text{masa sólido seco usada en la reacción}) * 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

3.2.5 Propiedades Físicoquímicas de las nanopartículas

3.2.5.1 *Determinación del tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad:*

Estas propiedades se midieron mediante el equipo Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instruments) bajo condiciones estándar (Dispersante: Agua, T: 25° C, láser 633 nm) y en triplicado para cada muestra.

3.2.5.2 *Evaluación de estabilidad de Nanopartículas*

Las suspensiones de Nps obtenidas por GI y SFD descritas en 3.2.1.1 y 3.2.1.2 respectivamente fueron almacenadas a 4°C. Una vez por semana, durante un periodo de 6 semanas, se tomaron muestras y fueron analizadas de acuerdo al procedimiento descrito en 3.2.5.1.

3.2.6 Ensayos de Liberación de Timol desde las Nanopartículas

Se utilizó el dispositivo de celdas de Franz de flujo continuo. Para el ensayo se dispuso 1 mL de suspensión de nanopartículas obtenidas por GI o SFD en el compartimiento dador provisto de un filtro de membrana de 0,05 μm (Durapore PVDF Millipore), Se utilizó agua destilada como medio de disolución, el flujo se ajustó para entregar un caudal de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 7 días. Cada día las muestras recolectadas se midieron por HPLC a 220 nm. Los resultados obtenidos se expresaron como μg de timol por mL de muestra.

Se utilizó la ecuación (4) de Ritger & Peppas para modelar los datos de disolución de timol:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Eq. (4)}$$

Donde:

M_t : cantidad de timol liberada a un tiempo dado

M_∞ : cantidad de timol presente en la nanopartícula

k : constante de velocidad de disolución

t : tiempo de liberación

n : exponente de liberación

3.2.7 Evaluación de Actividad Antifúngica de Nanopartículas frente a micelio de *Botrytis cinerea*.

3.2.7.1 Preparación de los inóculos de *Botrytis cinerea*:

Se cultivó el hongo en superficie de placa con agar papa dextrosa durante 5 días a 25°C, hasta observar desarrollo de abundante de micelio. Estas placas de Petri se mantuvieron refrigeradas hasta su utilización.

3.2.7.2 Inhibición del micelio de *Botrytis cinerea*

La actividad antifúngica de las nanopartículas de quitosano-timol elaboradas por ambos métodos fue evaluada mediante la inhibición del desarrollo radial en placa del micelio del hongo. Para ello, en forma estéril se tomó con un sacabocado una porción de micelio desde la cepa previamente cultivada, este trozo de micelio fue colocado en el centro de una placa de agar Papa dextrosa mezclada con diferentes diluciones de solución de nanopartículas para obtener en el agar concentraciones, en mg/mL, adecuadas para dispersión diluida al 10 % v/v, dispersión diluida al 25 % v/v y dispersión diluida al 50 % v/v de acuerdo a lo especificado en la tabla 1. Estas placas fueron incubadas durante 5 días a 25°C, siendo evaluada cada 24 h. La actividad antifúngica fue determinada a través del radio de propagación del micelio de las placas y fueron comparadas con placas de agar que contenían la solución control de timol en las mismas diluciones y un cultivo control del hongo sembrado en placa sin tratamiento cuya propagación por la superficie de la placa Petri, equivalente al 100% de desarrollo, el cual fue utilizado como parámetro de comparación de crecimiento.

Tabla 1: Concentraciones de quitosano y timol (mg/mL) utilizadas en el ensayo antifúngico para los 5 tratamientos en diluciones al 10, 25 y 50%.

Tratamiento	Timol (mg/ml)	Quitosano (mg/ml)
NPs-QT-GI 10%	0,1	0,2
NPs-QT-GI 25%	0,2	0,4
NPs-QT-GI 50%	0,3	0,9
NPs-Q-GI 10%	0,0	0,2
NPs-Q-GI 25%	0,0	0,4
NPs-Q-GI 50%	0,0	0,9
NPs-QT-SFD 10%	0,1	0,2
NPs-QT-SFD 25%	0,2	0,4
NPs-QT-SFD 50%	0,3	0,9
NPs-Q-SFD 10%	0,0	0,2
NPs-Q-SFD 25%	0,0	0,4
NPs-Q-SFD 50%	0,0	0,9
QT 10%	0,1	0,2
QT 25%	0,2	0,5
QT 50%	0,3	1,0

3.2.8 Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Como estadígrafos se utilizaron promedio y desviación estándar para realizar el análisis de datos. Se utilizó ANOVA de una y dos vías según fuese necesario y una prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.03.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersión y potencial Zeta en nanopartículas de quitosano y quitosano-timol obtenidas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido.

Los resultados obtenidos para el Z-average, índice de polidispersidad y potencial Z (ξ) para las nanopartículas elaboradas por ambos métodos se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Diámetro Hidrodinámico, Índice de Polidispersidad y Potencial-Z en nanopartículas de quitosano y quitosano-timol elaboradas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido.

Tipo de NPs	Z-average (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
NPs-Q-GI	166,5 ^a ± 13,9	0,37 ± 0,02	39,9 ^b ± 5,7
NPs-QT-GI	287,2 ^b ± 10,6	0,45 ± 0,07	47,4 ^b ± 4,8
NPs-Q-SFD	204,1 ^a ± 11,7	0,31 ± 0,01	19,7 ^a ± 2,4
NPs-QT-SFD	289,6 ^b ± 18,7	0,41 ± 0,01	20,6 ^a ± 1,4
NPs-QT-SFD-N/U	953,7 ^c ± 101,2	0,72 ± 0,05	22,1 ^a ± 3,2

^{a, b, c}: letras iguales indican grupos homogéneos, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

NPs: nanopartículas

GI: gelificación iónica

SFD: atomización-congelación en nitrógeno líquido con tratamiento de ultrasonido.

N/U: sin tratamiento de ultrasonido

Q: quitosano

T: timol

Para las nanopartículas elaboradas por el método de gelificación iónica, con y sin timol, se obtuvieron diámetros hidrodinámicos de $287,2 \pm 10,6$ y $166,5 \pm 13,9$ nm respectivamente, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos tamaños.

En el caso de las nanopartículas obtenidas por atomización-congelación, incluyendo una etapa adicional de ultrasonido, se registraron valores de $289 \pm 18,7$ nm en el

caso de incluir timol y $204 \pm 11,7$ nm en ausencia del compuesto. Al comparar nanopartículas SFD con y sin timol, con su correspondiente elaborada por GI, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tamaño.

Por otro lado, Nps-SFD y Nps-SFD-N/U presentaron diferencias significativas, ya que la aplicación de ultrasonido logró la reducción del tamaño de $953,7 \pm 101,2$ a $289,6 \pm 18,7$ nm.

En la literatura se reportan similares tamaños para nanopartículas fabricadas por GI a los obtenidos en este trabajo. Se describe un rango que va desde los 100 a 350 nm (Calvo y cols., 1997; Caro, 2015., Caro y cols., 2016; Goycoolea y cols., 2009; Fan y cols., 2012).

El tamaño de las NPs puede verse afectado por la aplicación de energía mecánica, variaciones en tiempos de tratamiento, distintas concentraciones de quitosano y/o TPP, cambio de pH y temperatura (Lang, y cols., 2008; Fan y cols., 2012) así como el peso molecular y el grado de acetilación del quitosano. El aumento progresivo de la concentración de la solución de quitosano, manteniendo constante la relación en masa Q:TPP, muestra un aumento lineal del tamaño de partícula cualquiera sea el peso molecular de éste, sin embargo, cuando se utiliza quitosano de bajo peso molecular se obtienen menores tamaños de partícula y se ve un menor efecto en el aumento de tamaño de la NP debido al aumento de concentración de quitosano (Gan y cols., 2005). Por otro lado, la relación de masa Q:TPP también ha sido estudiada, registrando un aumento lineal en el tamaño de la NP cuando se incrementa esta relación (Gan y cols, 2005).

En el presente trabajo se utilizó quitosano de bajo peso molecular, a una concentración de 3,0 mg/mL y una relación quitosano-TPP de 6:1 obteniéndose resultados concordantes con Medina (2019) que preparó Nps utilizando una solución de quitosano de 3,0 mg/mL, con un peso molecular de 269 kDa, a un pH de reacción de 4,1 y generó nanopartículas de diámetro hidrodinámico 175 ± 21 nm, similar al diámetro medido por microscopía electrónica de transmisión (153 ± 42 nm) para nanopartículas obtenidas por gelificación iónica sin timol. Rampino y cols., (2013) utilizando la misma proporción de Quitosano-TPP, con una solución de quitosano de 2,5 mg/mL y un peso molecular de 150 kDa obtuvieron nanopartículas

con un Z_{average} de aproximadamente 200 nm. Koukaras y cols., (2012) preparando una solución de quitosano de 2,0 mg/mL y un peso molecular mayor de 350 kDa obtuvieron un Z_{average} de aproximadamente 500 nm a la misma proporción de quitosano y TPP. Los resultados previos indican que cuando se usa una solución de alta concentración de quitosano, cercana a su concentración crítica de entrelazamiento de 2,5 mg/mL (C^*) y de alto peso molecular, se incrementa el tamaño y PDI de las NPs.

Nuestro grupo ha fabricado nanopartículas por atomización-congelación en nitrógeno líquido en donde se ha encapsulado inulina y prednisolona (Gamboa y cols, 2015) obteniéndose tamaños considerablemente mayores (643 ± 32 nm) que los descritos aquí. Previo a este trabajo, se ha estudiado el efecto del ultrasonido en la reducción de tamaño de las NPs elaboradas por este método, donde se logró reducir el tamaño hasta $181 \pm 8,9$ nm, usando condiciones extremas (Tiempo total de aplicación: 30 min, Amplitud: 80%, pulsos durante 30 seg) (Díaz, 2015). En este estudio, las nanopartículas que no fueron expuestas a un post tratamiento de ultrasonido (NPs-QT-SFD-N/U) presentaron un elevado tamaño cercano a 1 micrón ($953,7 \pm 101,2$ nm), al aplicar ultrasonido se logra una reducción de alrededor de un 70% del diámetro hidrodinámico inicial.

Durante la ultrasonicación se generan altas fuerzas de cizallamiento que provocan la despolimerización de la cadena de quitosano por la escisión del enlace 1,4-glucosídico (Tang y cols., 2003) entregando nanopartículas fragmentadas de un tamaño considerablemente reducido. Sin embargo, Esmaeilzadeh-Gharedaghi y cols., (2012) realizó un estudio de los parámetros que afectan a la reducción de tamaño de nanopartículas de quitosano en solución, determinando que para la ruptura de la molécula de quitosano se necesita una amplitud media mínima de 55% y un tiempo de proceso mínimo de 500 seg, independiente de la concentración de quitosano utilizada. En el presente estudio se utilizaron condiciones menos destructivas, alcanzando una amplitud media mínima de 40% durante un periodo de 300 seg, por lo que es poco probable que la reducción del tamaño de las Nps se deba a daño molecular.

Los índices de polidispersidad (PDI) obtenidos para los 4 primeros tipos de NPs se encuentran en el intervalo entre 0,31 y 0,45, encontrándose dentro del valor recomendado (menor a 0,7) por Müller y cols, (2001) para una muestra monodispersa, ya que a valores superiores, existe alta heterogeneidad de tamaños entre las nanopartículas y alto grado de aglomeración de ellas, hecho que ocurre en el caso de las NPs-QT-SFD-N/U que releva valores de PDI de 0,72.

Es sabido que durante la elaboración de las nanopartículas por SFD la solución utilizada retiene compuestos libres de la formulación, como surfactante y timol sin cargar. Este sistema particulado induce a la agregación y en algunos casos a la fusión irreversible de nanopartículas luego de los procesos estresantes a nivel molecular de congelado y secado por liofilización. Soluciones de quitosano nanoparticulado sometidas al proceso de SFD sin la adición de agentes crioprotectores presentan intensa aglomeración debido a la formación de puentes de hidrógeno en y entre las moléculas (Abdelwahed y cols., 2006). Por tanto, la significativa reducción del tamaño de las nanopartículas y disminución del PDI post tratamiento ultrasonido son atribuibles a su efecto desaglomerador producto de la ruptura de los puentes de hidrógeno generados durante la elaboración por método SFD.

La tabla 2 indica que el potencial Z de las Nps obtenidas por GI es aproximadamente el doble del obtenido a igual formulación (con o sin timol) con respecto a las obtenidas por SFD. Para ambos métodos debiese existir una disponibilidad similar de grupos amino protonados debido a que se utilizó la misma concentración de quitosano, sin embargo, esto no ocurrió. Una posible explicación se basa en la concentración de iones hidrógeno disponible en cada suspensión de nanopartículas, el método de GI se elabora sobre una solución ácida en la que se disuelve el quitosano y que se mantiene como medio de suspensión durante todo el proceso, formando parte de la solución final, esto conlleva una mayor protonación de los grupos amino del quitosano y en una mayor carga superficial respecto a la

otra metodología, ya que por otra parte, el método SFD elimina el componente ácido durante el proceso de liofilización, y se reconstituye en agua destilada como medio final.

En el caso del método de GI, se ha investigado que la potencial zeta disminuye en la medida que se aumenta la concentración del quitosano en la solución, mientras que se eleva su valor al aumentar la relación de quitosano respecto al TPP, la presencia de un polianión neutraliza las cargas positivas del quitosano, generando un descenso del potencial zeta (Expósito, 2010). Gan y cols., (2005) reportaron potenciales zeta de +35,6 mV a la misma concentración de quitosano utilizada en esta tesis.

Por otro lado, para las NPs SFD, en literatura se reportan potenciales de 16-38 mV (Díaz, 2015., Nobeta, 2014., Gamboa y cols., 2015). En nanopartículas de quitosano, el potencial zeta posee una tendencia a aumentar en la medida que incrementa el tiempo en suspensión, alcanzando aproximadamente ± 30 mV a las 24 h (Gamboa y cols., 2015). Díaz (2015) midió potenciales de $19,6 \pm 2,18$ en la elaboración de Nps quitosano timol por SFD, aun así, estas nanopartículas fueron estables en suspensión, una posible explicación es el efecto del ultrasonido en el tratamiento, ya que este conduce a una rápida desintegración de partículas aglomeradas, generando una distribución de tamaño homogénea y reduciendo el efecto de las fuerzas de van der Waals entre las partículas por periodos más extensos. (Gokce y cols., 2014). En el caso de las NPs-QT-SFD-N/U, no se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) contra aquellas que incluyeron tratamiento de ultrasonido, Tang y cols., (2003) reportaron estudios de nanopartículas con y sin tratamiento de cavitación y concluyó que el uso de este post tratamiento preserva la densidad de carga en la superficie de las NPs, por lo que es esperable un potencial similar.

4.2 Estabilidad del diámetro hidrodinámico y potencial zeta en nanopartículas quitosano-timol elaboradas por métodos GI y SFD.

Se evaluó la estabilidad de nanopartículas quitosano-timol en suspensión generadas por ambos métodos, almacenadas a 4°C durante 6 semanas. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de nanopartículas quitosano-timol almacenadas durante 6 semanas a 4°C.

Tiempo (Semanas)	<i>Z-average (nm)</i> <i>Media ± D.E</i>	<i>Potencial Z (mV)</i> <i>Media ± D.E</i>	<i>Z-average (nm)</i> <i>Media ± D.E</i>	<i>Potencial Z (mV)</i> <i>Media ± D.E</i>
	NPs-QT-GI		NPs-QT-SFD	
0	287,2 ^a ± 10,6	47,4 ^a ± 4,8	289,6 ^a ± 18,7	20,6 ^a ± 1,4
6	299,4 ^a ± 10,3	47,7 ^a ± 2,4	286,2 ^a ± 15,0	22,2 ^a ± 2,9

^a: letras iguales indican grupos homogéneos, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Durante el periodo de almacenamiento de 6 semanas (42 días) no se produjo un cambio significativo en el diámetro hidrodinámico, ni en el potencial zeta. Está descrito que el nanogel de quitosano/TPP se comporta como un sistema metaestable, sufre una espontánea agregación y desagregación bajo condiciones moderadas en un corto periodo de tiempo, lo que se explica por la baja fuerza iónica en el medio, la alta densidad de entrecruzamiento, un tamaño de partícula pequeño, con una estrecha distribución (Fan y cols., 2012)

Fan, y cols., (2012) determinó que NPs-GI son estables al menos durante 20 días a temperaturas que oscilan entre 10-20°C. Medina y cols., (2019) reportan resultados similares en nanopartículas quitosano-timol aplicando ambos métodos de elaboración, durante un periodo de 4 semanas, en condiciones de temperatura ambiente (15-20°C).

Díaz (2015) estudió la estabilidad de nanopartículas QT-SFD con y sin la aplicación de ultrasonido, concluyó que al aplicar ultrasonido y medir la estabilidad de las

suspensiones almacenadas en condiciones de refrigeración (4°C) durante 57 días, las NPs no presentaban diferencias significativas ($p > 0,05$) en diámetro hidrodinámico, en cambio, aquellas sin el tratamiento de ultrasonido, eran inestables presentando grandes variaciones de tamaño.

4.3 Rendimiento, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación en nanopartículas de quitosano-timol elaboradas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido

Los parámetros de encapsulación se resumen en la tabla 4. Se determinó la capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y rendimiento en nanopartículas quitosano-timol obtenidas por gelificación iónica y atomización-congelación.

Tabla 4. Rendimiento en partículas (RnP%), capacidad de carga (CC%) y eficiencia de encapsulación (EE%) en nanopartículas de quitosano-timol elaboradas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido.

Tipo de NPs	CC %	EE %	RnP %
NPs-QT-GI	5,56 ^b ± 0,31	56,53 ^b ± 2,06	72,78 ^c ± 3,78
NPs-QT-SFD	4,73 ^a ± 0,51	37,46 ^a ± 0,91	42,47 ^a ± 4,13
NPs-Q-GI	-	-	62,39 ^b ± 1,95
NPs-Q-SFD	-	-	68,37 ^b ± 1,40

^{a, b, c} letras iguales indican grupos homogéneos, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

La CC% en Nps QT-GI fue de $5,56 \pm 0,31\%$, mientras que en NPs QT-SFD fue de un $4,73 \pm 0,51\%$, en el caso de la EE% fue de $56,53 \pm 2,06\%$ y $37,46 \pm 0,91\%$ respectivamente. Keawchaon y Yoksan (2011) trabajaron con nanopartículas de quitosano cargadas con carvacrol (isómero del timol) mediante gelificación iónica. En aquel estudio se trabajó con quitosano de 760 kDa de peso molecular para elaborar una solución de quitosano de 12 mg/mL en distintas proporciones de peso

Quitosano/Carvacrol variando desde 1/0,25 hasta 1/1,25. Las EE% y CC% fluctuaron entre 13,6 – 27,8% y 2,7 – 21,2% respetivamente.

Para una proporción de masa en el sistema quitosano/carvacrol de 1/0,25, similar a la utilizada con timol en esta tesis, se obtuvo una EE=13,6% y una CC=2,7%. Por tanto, la EE y CC para timol fueron mayores que para el carvacrol. Esta diferencia posiblemente se justifique por la mayor proporción en masa de Quitosano/TPP (6/1) usada para la encapsulación de timol respecto a la proporción de masa Quitosano/TPP en la encapsulación de carvacrol (2,4/1).

Los resultados son concordantes con los obtenidos por Medina (2019) quien obtuvo valores de EE% y CC% cercanos al 60% y 3% respetivamente para nanopartículas de quitosano/timol elaboradas por GI y en una relación Quitosano/TPP de 6/1.

Pruebas de nanoencapsulación de carvacrol y aceite esencial de *Carum copticum* (CEO) en nanopartículas de quitosano-TPP muestran que la capacidad de carga de las nanopartículas escala proporcional en la medida que se aumenta la cantidad del aceite esencial en la proporción Q : Carvacrol (o CEO). Sin embargo, la eficiencia de encapsulación no sigue este comportamiento, el cual varía por limitaciones propias de la encapsulación presentando valores con diferencias de hasta un 20% dependiendo del activo encapsulado (Keawchaoon y Yoksan 2011., Esmaeili y Asgari, 2015). Gan, y cols., (2005) mostraron que manteniendo constantes las condiciones experimentales, la nanoencapsulación de insulina en nanopartículas QTPP lograba eficiencias de encapsulación de un 65,6% cuando la relación en masa de Q-TPP era 6:1, mientras que si se modificaba a 5:1 la EE% aumentaba a un 81%, esto se debe a que una mayor concentración de TPP respecto a la de quitosano trae consigo un aumento de iones fosfatos cargados negativamente, los cuales generan a su vez un incremento en las interacciones iónicas de los grupos aminos del quitosano proporcionando mayor entrecruzamiento que retiene al activo (Ko y cols, 2002)

Nobeta (2014) trabajó la encapsulación de timol en nanopartículas de quitosano timol mediante el método de SFL utilizando similares proporciones (0,5 mg timol por mL de solución, 3 mg Quitosano por mL de solución), obtuvo un valor de CC% =

1,07% y una EE= 49,78%. El autor explica que los valores bajos obtenidos para estos parámetros son producto de la pérdida del timol durante el proceso de atomización y congelación de las soluciones, se piensa que durante el proceso de atomización existiría una desestabilización de las gotas de solución en la interfase agua-aire debido a un lento proceso de congelación con el vapor de nitrógeno líquido. (Hu y cols, 2008). De esta forma, podría darse una separación de fases donde quedasen gotas concentradas de timol libre en el solvente, siendo parte de la merma.

Díaz (2015) utilizó como solvente ácido cítrico 0,1% y ácido acético 1% en la metodología de elaboración de las nanopartículas SFD, del primer método obtuvo un CC% = 1,83% y EE%= 55,5% mientras que al cambiar el solvente tuvo una mejoría en los resultados con un CC%= 6,8% y EE%= 91,7%, el autor explica que durante la pulverización–congelación, se evapora la totalidad del ácido acético que se encuentra en estado líquido (P.E:118°C y P.F: 16°C) a 25°C, mientras que el ácido cítrico (P.E: 175°C y P.F:153°C) en las mismas condiciones se mantiene constante. Dicha eliminación del solvente aumenta la capacidad de carga en el interior de la nanopartícula. Sin embargo, este proceso también favorece la salida por arrastre del activo durante la pulverización-congelación y en etapa de sublimación durante la liofilización, con lo cual se obtendrían menores eficiencias de encapsulación (Hu y cols., 2008).

Por otra parte, Gamboa y cols., (2015) en sus resultados de nanoencapsulación mediante atomización-congelación en nitrógeno líquido aplicado a inulina y prednisolona obtuvo resultados muy variables en sus parámetros de encapsulación, la eficiencia de encapsulación de la inulina arrojó un 37%, mientras que para la prednisolona logró un 72,4%, la capacidad de carga osciló entre un 6,6-12,8% para ambos compuestos.

En el caso del rendimiento de partícula varió entre el 42 y 72% cuando se determinó para las nanopartículas por ambos métodos en presencia y ausencia del activo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los rendimientos de cada par de Nps con su correspondiente método, $72,78 \pm 3,78\%$ en QT-GI versus $62,39 \pm$

1,95% para Q-GI en el caso de gelificación iónica y $42,47 \pm 4,13\%$ en QT-SFD contra $68,37 \pm 1,4\%$ en Q-SFD cuando se aplicó atomización-congelación.

Antoniou y cols., (2015) reportaron que al generar NPs de Q:TPP en la relación 6:1 (igual a este estudio) obtenía un RP% cercano al 55%, sin embargo en su metodología trabaja a 10.000 x g, mientras que este estudio aplica 21.000 x g, lo que genera divergencia en la separación de partículas y agregados.

Gamboa y cols, (2015) obtuvieron un 80% de RP% para NPs de Q por SFD, en contraste utilizó un sistema cosolvente hexano-pluronic distinto al de este estudio, esto puede haber generado diferencias en los resultados.

Nobeta (2014) obtuvo un rendimiento de 42,1% para la encapsulación de timol en condiciones similares a las de este estudio, descritas anteriormente.

4.4 Acción inhibitoria de nanopartículas quitosano y quitosano-timol enfrentadas al micelio de *Botrytis cinerea*.

Se evaluó la capacidad antifúngica de las nanopartículas frente a la forma vegetativa de *Botrytis cinerea*. Se ensayó la inhibición del desarrollo de micelio de este hongo mediante la adición de concentraciones diluidas al medio de cultivo de las dispersiones de NPs-QT al 10%, 25% y 50% (v/v) siendo comparadas frente a las dispersiones de Nps-Q, y una solución de quitosano-timol que contiene cantidades equivalentes a las utilizadas en las NPs.

Como control se usó el medio de cultivo, en el cual se desarrolló el hongo en la totalidad de la superficie de la placa de Petri equivalente al 100% de crecimiento. El desarrollo micelar para todos los tratamientos se muestra a continuación.

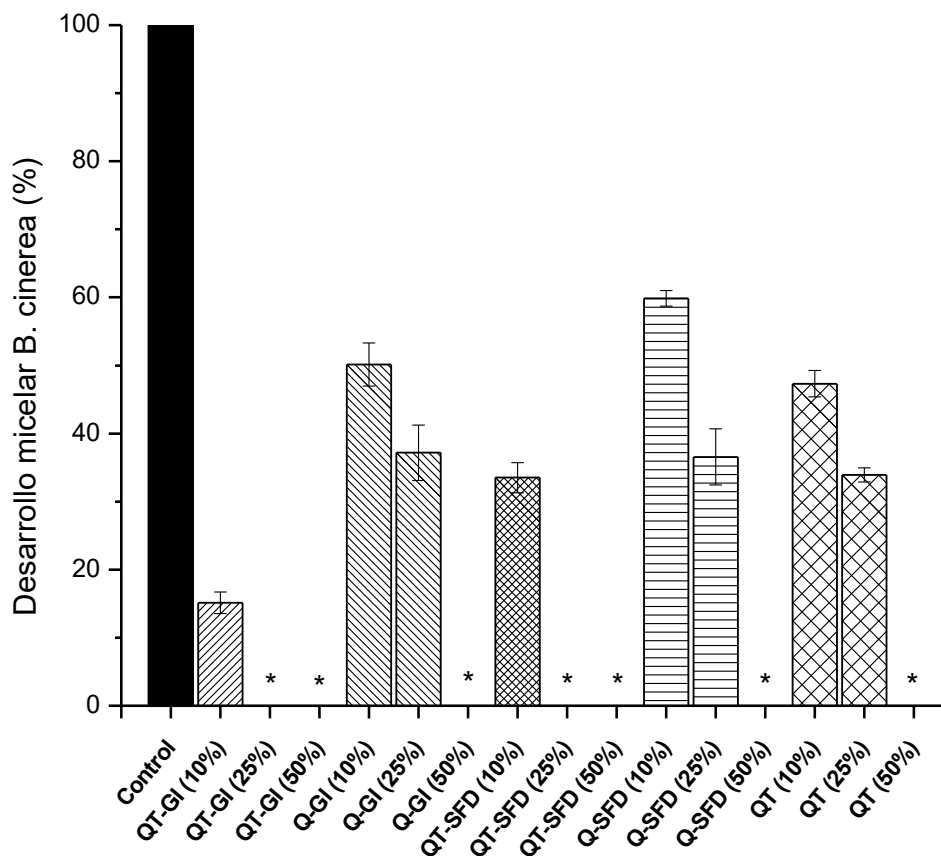


Fig. 5: Desarrollo micelar porcentual de *Botrytis cinerea* respecto al control de viabilidad para los 5 tratamientos utilizados. (*) Indica ausencia de crecimiento del hongo por parte del tratamiento.

Los resultados resumidos en la Fig. 5 muestran que todos los tratamientos usados tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la *Botrytis cinerea*, y este efecto es proporcional, ya que a mayor concentración de la solución tratamiento en el medio, mayor efecto inhibitorio. En todas las diluciones al 50% se logró inhibir el crecimiento del hongo en su totalidad. En el caso de NPs QT-GI, cuando se trabajó en una dilución al 10 % inhibe un $84,9 \pm 1,6\%$ del crecimiento del hongo, mientras que a mayores concentraciones (25% y 50%) lo inhibe en un 100%. Las NPs Q-GI al 10 y 25% solo inhiben el 49,9 y 62,8% del crecimiento del control de viabilidad respectivamente.

Para las Nps QT-SFD, solo hay crecimiento del hongo en dilución al 10%, donde se consigue un 64,5% de control sobre el crecimiento del micelio. Estas mismas

nanopartículas en ausencia de timol (Q-SFD) no impiden el crecimiento del hongo al 10 ni al 25% de dilución, obteniendo un 40,1% de inhibición en el primer caso y un 63,4% en el segundo. Finalmente, la solución de mezcla quitosano y timol consigue el 52,7% de inhibición de crecimiento para una dilución al 10%, mientras que al 25% logra aumentar a un 66,1% el efecto.

Los tratamientos nanoparticulados con timol generan el mayor efecto inhibitorio en todos los tratamientos y diluciones evaluadas, siendo los únicos en lograr el 100% de inhibición en diluciones al 25%, esto se debe al efecto sinérgico del sistema Q-T en forma de nanopartícula que es capaz de potenciar su efecto inhibitorio en un 12-30% (dependiendo de la dilución) respecto a una solución mezcla de Q-T (sin formar nanopartículas) (Caro, y cols., 2016; Medina y cols., 2019)

Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en NPs –QT obtenidas por GI y SFD. A una dilución del 10% es más eficiente en la inhibición de micelio de *Botrytis cinerea* se debe a una liberación más temprana de timol desde las NPs obtenidas por GI respecto a las obtenidas por SFD, tal como se observa en el estudio de liberación de timol que se muestra en la siguiente sección. Se ha descrito que un incremento en las concentraciones de timol conlleva a un menor desarrollo del hongo por su efecto fungicida en etapas tempranas (Abbaszadeh y cols., 2014)

4.5 Perfil de liberación de timol desde nanopartículas quitosano-timol por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido

Se estudió la liberación de timol desde las nanopartículas por gelificación iónica y atomización-congelación mediante ensayos de difusión en celdas de Franz durante 7 días a 25°C. Como requisito previo se determinó realizar el ensayo en condición “sink”, manteniendo la concentración del activo en el medio de disolución inferior al 10% de la concentración de saturación (1000 ppm a 25°C) (Caro y cols., 2016).

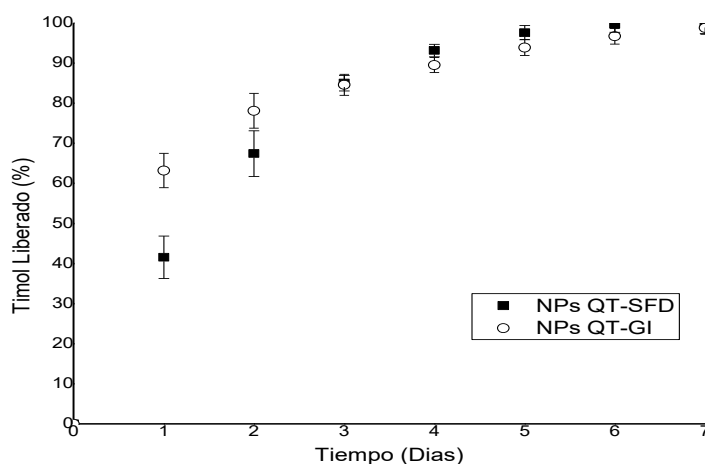


Fig. 6: Porcentaje de masa de timol liberada por nanopartículas quitosano-timol elaboradas por los métodos de gelificación iónica y atomización-congelación en nitrógeno líquido durante 7 días.

En las primeras 24 h, la suspensión de Nps-QT-GI liberó un 63,2% de la masa de activo nanoencapsulada, en cambio Nps-QT-SFD entregó solo un 43,1% al medio acuoso. A las 48 h, un 78% de timol había sido liberado en Nps-QT-GI, mientras que Nps-QT-SFD alcanzó el 67%. A las 72 h, se asemejan los porcentajes de masa de timol liberada por ambos métodos (redondeado al 80%), se observa la ralentización en la liberación del activo por parte de NPs GI, mientras que dicha liberación se mantiene relativamente constante en el caso NPs SFD.

Los datos de liberación de timol se modelaron usando Ritger & Peppas (1987) mediante la ecuación 5:

$$\text{Ecuación x: } \frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Eq. (5)}$$

Donde M_t corresponde a la cantidad de timol liberada a cualquier tiempo dado, M_∞ es la máxima cantidad de timol disponible para liberar, k es la constante cinética para el sistema, t es el tiempo de liberación, n es el exponente de liberación. Este último es usado para indicar el tipo de comportamiento difusional fickiano o no-fickiano. Para partículas esféricas, un valor $n \leq 0,43$ indica una liberación Fickiana, para un $n \geq 0,85$ indica un Transporte Caso II, valores intermedios donde $0,43 < n < 0,85$ indican una liberación No-Fickiana. (Keawchaon y Yoksan, 2011; Ritger y Peppas, 1987).

Tabla 5: Valores calculados para el exponente de liberación (n), la constante cinética (k) y el coeficiente de Pearson (r^2) en nanopartículas por gelificación iónica y por atomización-congelación en nitrógeno líquido

<i>Tipo NPs</i>	<i>n</i>	<i>k (min⁻¹)</i>	<i>r²</i>
QT-GI	0,226	0,125	0,9842
QT-SFD	0,421	0,021	0,9294

Como se muestra en los resultados de la Tabla 6, ambos tipos de nanopartículas siguieron un comportamiento “fickiano” en el cual la liberación es causada principalmente por difusión y en menor medida por el hinchamiento y relajación del polímero. Andretta (2003) explica que en los casos en los cuales la matriz tiene poca interacción con el fluido ingresante se expande muy poco, por lo que la difusión del activo dependerá del fluido entrante al sistema, con lo que puede afirmarse que el fenómeno principal que afecta a la velocidad de liberación es el gradiente de concentración y se considera que la constante de difusión es independiente de la concentración de polímero utilizado.

El valor de k fue mayor para el sistema Nps-QT-GI respecto a Nps-QT-SFD lo que indica que éstas liberan más rápido el activo, observado dentro de los dos primeros días.

En el caso de agentes activos parcialmente solubles en agua (entre 0,5 y 5 mg/mL) como es el caso de timol (1 mg/mL a 20°C) la velocidad de liberación depende de la velocidad de infiltración e hinchamiento de la matriz en conjunto con la velocidad de erosión del núcleo matricial (Shah y cols., 2012). Este antecedente ayuda a comprender que la diferencia en el perfil de liberación del timol por parte de ambos métodos radica en la conformación de la nanoestructura Q-T que favorece la retención de la fracción de timol, se presume que el método SFD formaría nanopartículas con mayor densidad de quitosano y/o más compactas, formando mejor barrera contra el ingreso del medio al que son expuestas, prolongando la estadía del activo retenido en la matriz.

Keawchaon y Yoksan (2011) estudiaron la liberación de carvacrol a partir de una matriz quitosano-TPP y se obtuvo valores de n en un rango de 0,26-0,31 evidenciando un comportamiento Fickiano similar al observado en este estudio.

5. CONCLUSIONES

La aplicación de un tratamiento de ultrasonido sobre las nanopartículas de quitosano/timol obtenidas por SFD permitió reducir el tamaño de las nanopartículas en relación a las sin tratamiento desde valores 953,7 nm a 289,6 nm, al igual que el PDI fue disminuido en un 58,6 %y también hubo un cambio con el potencial z a valores más positivos (desde 39,9 a 47,7) lo cual demuestra que el ultrasonido es capaz de desagregar nanopartículas a tamaños menores (70% menor en relación al diámetro hidrodinámico inicial) y lograr una dispersión más uniforme de ellas.

Mediante la técnica de gelificación iónica se obtuvieron nanopartículas de quitosano de un Z average de $166,5 \pm 13,9$ nm, un índice de polidispersión de 0,37 y un potencial zeta de $39,9 \pm 5,7$ mV. En caso de encapsular timol se obtuvo un Z average de $287,2 \pm 10$ nm, un PDI de 0,45 y un potencial zeta de $47,4 \pm 4,8$ mV.

Las nanopartículas obtenidas por ambos métodos y almacenadas a 4°C se mantuvieron estables por 6 semanas, lo que las hace funcionales para diferentes aplicaciones en las condiciones señaladas

En nanoencapsulación por pulverización-congelación se obtuvo una capacidad de carga de 4,73%, una eficiencia de encapsulación de 37,5% y un rendimiento de partícula de 42,47% y por otra parte la nanoencapsulación de timol por gelificación iónica presentó una capacidad de carga de 5,56%, una eficiencia de encapsulación de 56,5% y un rendimiento de partícula de un 72,8%.

Ambos tipos de nanopartículas tuvieron efecto inhibitorio sobre el micelio de *Botrytis cinerea*, siendo proporcional este efecto a la concentración de nanopartícula presente en el medio. La forma nanoparticulada de quitosano/timol tuvo mayor efecto inhibitorio que la aplicación de una solución quitosano/timol revelando un efecto sinérgico en el estado encapsulado. A concentraciones más bajas de nanopartículas (10%), el tratamiento por gelificación iónica tuvo un mayor porcentaje de inhibición que SFD, en concentraciones mayores (25, 50%) registra inhibición total del hongo.

Ambos tipos de nanopartículas presentan un mecanismo de liberación fickiano, dependiendo principalmente de la difusividad del activo en el medio. La velocidad de liberación de timol fue mayor en nanopartículas por gelificación iónica que por pulverización-congelación en nitrógeno líquido. Esto se explicaría porque las nanopartículas GI mostraron un mayor control de la liberación de timol que las correspondientes a SFD, de acuerdo a las cinéticas de liberación estudiadas en medio acuoso a 25°C. Se presume que el método SFD forma nanoestructuras más densas que retienen de mejor manera al activo. Estas diferencias observadas en las cinéticas de liberación, permite la selección de una o la otra dependiendo de la aplicación que se le quiera dar a las nanopartículas.

6. REFERENCIAS

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1688–1713.

Abugoch, L., Tapia, C., Villamán, M., Yazdani-Pedram, M. & Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25, 879-886.

Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale*, 24, 6-51.

Agnihotri, S., Mallikarjuna, N. & Aminabhavi, T. (2004). Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28.

Anandharamakrishnan, C. (2017). *Handbook of Drying for Dairy Products*. Indian Institute of Crop Processing Technology. John Wiley & Sons. (3ª. Ed.) *Spray Freeze Drying* (pp.123-140).

Andreetta, H. (2003). Fármacos de acción prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 355-364.

Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, Jing., Yokoyama, W. & Zhong, Fang. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137-146.

Calvo, P., Remunan Lopez, C., VilaJato, J. L. & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132.

Caro, N. (2015). Incorporación mediante tecnología de inyección térmica de nanopartículas con agentes antimicrobianos a películas de quitosano y proteína de quinoa con potencial aplicación en frutas frescas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad

de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, (pp.146).

Caro, N., Medina, E., Díaz-Dosque, M. López., L., Abugoch, L. & Tapia, C. (2016) Novel active packaging based on films of chitosan and chitosan/quinoa protein printed with chitosan-tripolyphosphate-thymol nanoparticles via thermal ink-jet printing. *Food Hydrocolloids*, 52, 520-532.

Coley-Smith J.R., Jarvis, W. R. & Verhoeff, K. (1987). The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK. *Sclerotia and other structures in survival*. (pp.85-114)

Cotoras, M. & Silva, E. (2005). Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia*, 97, 485-492.

Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M. & Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Food Science & Technology*, 24, 30-46.

Díaz, J. (2015) Optimización de la obtención de nanopartículas de quitosano/timol y su incorporación en recubrimientos comestibles de proteínas de quínoa y quitosano, para su aplicación en frutillas frescas (*Fragaria x ananassa*) y aumentar su vida útil. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, (pp.78).

Di Matteo, P., Donsi, G. & Ferrari, G. (2003). The role of heat and mass transfer phenomena in atmospheric freeze-drying of foods in a fluidized bed. *Journal of Food Engineering*, 59, 267–275.

Dwivedi, P., Nayak, V. & Kowshik, M. (2015). Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. *Biotechnology Progress*, 31, 1416-1423.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. & Denle, N. (2007). *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Springer Netherlands (1^a. Ed.) *The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces*, (pp.9-27).

Esmaeili, A. & Asgari, A. (2015). In Vitro release and biological activities of Carum copticum essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 283-290.

Esmaeilzadeh-Gharedaghi, E. Ali Faramarzi, M. Ali Amini, M. Rouholamini, A. Mahdi, S. & Amani, A. (2012). Effects of processing parameters on particle size of ultrasound prepared chitosan nanoparticles: An Artificial Neural Networks Study. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17, 638-647.

Expósito, R. (2010). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, (pp.171).

Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M., Corbo, M. & Sinigaglia, M. (2005). A study on the Antimicrobial Activity of Thymol Intended as a Natural Preservative. *Journal of Food Protection*, 68, 1664-1670.

Fan, W., Yan, W., Xu, Z. S., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 90, 21-27.

Galván, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A. & Smith, M. (2013). Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 108-112.

Gamboa, A., Araujo, V., Caro, N., Gotteland, M., Abugoch, L. & Tapia, C. (2015). Spray Freeze-Drying as an Alternative to the Ionic Gelation Method to Produce Chitosan and Alginate Nano-Particles Targeted to the Colon. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 4373–4385.

Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. & McCarron, P. (2005). Modulation of Surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65-73.

Gokce, Y., Cengiz, B., Yildiz, N., Calimi, A. & Aktas, Z. (2014). Ultrasonication of Chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 462, 75-81.

Goy, R., De Britto, D. & Assis, O. (2009). A review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19, 241-247.

Goycoolea, F., Remuñán-López, C. & Alonso, M. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela, (pp.103-131).

Hu, B., Pan, C., Sun, Y., Hou, Z., Ye, H. & Zeng, X. (2008). Optimization of Fabrication Parameters to Produce Chitosan-Triphosphate Nanoparticles for

Delivery of Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7451-7458.

Kausar, A. (2016). Scientific Potential of Chitosan Blending with Different Polymeric Materials. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 33, 384-412.

Keawchaon, L. & Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 163-171.

Ko, J., Park, H., Hwang, J. & Lee, J. (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 249, 165-174.

Koukaras, E., Papadimitrou S., Bikiaris, D. & Froudakis, G. (2012). Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. *Mol Pharm*, 9, 2856-2862.

Lang, T., Wei, S. & Huei, R. (2008). Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohydrate Polymers*, 71, 448-457.

Latorre, B., Elfar, K. & Ferrada, E. (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42, 1604-1620.

Leuenberger, H. (2002). Spray freeze drying – the process of choice for low water soluble drugs?. *Journal of Nanoparticle Research*, 4, 111–119.

MacLeod, C.S., McKittrick, J.A., Hindmarsh, J.P., Johns, M.L. & Wilson, D.I. (2006). Fundamentals of spray freezing of instant coffee. *Journal of Food Engineering*, 74, 451–461.

Marchese, A., Erdogan, I., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Fazel, S., Gortzi, O. & Mohammad, S. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414.

Marei, G., Andel, M. & Abdelgaleil, S. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103, 56-51.

Medina, E., Caro, N., Abugoch, L., Gamboa, A., Díaz-Dosque, M. & Tapia, C. (2019)

Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films. *Journal of Food Engineering*, 240, 191-198.

Mishra, M. (2015). Handbook of Encapsulation and Controlled Release. CRC Press (1ª. Ed.) Biodegradable Polymers: Drug Delivery Applications. (pp. 586-590).

Müller, R. H., Jacobs, C., y Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 3–19.

Mumenthaler, M. & Leuenberger, H. (1991). Atmospheric spray freeze-drying: a suitable alternative in freeze drying technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 72, 97–110.

Nobeta, H. (2014). Elaboración y catacterización de nanopartículas de quitosano y quitosano/timol mediante pulverización-congelación en nitrógeno líquido (SFL) y su incorporación a películas de quitosano/proteína de quínoa, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. (pp. 83)

Padma, S. & Anandharamakrishnan, C. (2015). Spray-freeze-drying approach for soluble coffee processing and its effect on quality characteristics. *Journal of Food Engineering*, 149, 171–180.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X. Hu, C. & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693–2700.

Racovita, S., Vasiliu, S., Popa, M. & Luca, C. (2009). Polysaccharides based on micro-and nanoparticles obtained by gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*, 54, 709-718.

Rajam, R. & Anandharamakrishnan, C. (2015). Spray freeze-drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Engineering*, 166, 95–103.

Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. & Cesaro, A. (2013) Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 219-228.

Ramos, M., Jiménez, A. & Garrigós, M. (2017). Active Nanocomposites in Food Contact Materials. *Nanoscience in Food and Agriculture*, 4, 1-44.

Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. & Rao, R. (2010). Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 5062-5069.

Ritger, P. & Peppas, N. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and Anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled Release*, 5, 37-42

Rogers, S., Wu, W.D., Saunders, J. & Chen, X.D. (2008). Characteristics of milk powders produced by spray freeze drying. *Drying Technology*, 26, 404–412.

Rui, O. & Hahn, M. (2007). The *Botrytis cinerea* hexokinase, Hxk1, but not the glucokinase, Glk1, is required for normal growth and sugar metabolism, and for pathogenicity on fruits. *Microbiology*, 153, 2791-2802.

Shah, B., Davidson, P. & Zhong, Q. (2012). Nanocapsular Dispersion of thymol for Enhanced Dispersibility and Increased Antimicrobial Effectiveness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Model Food Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8448-8453.

Skandamis, P. & Nychas, G. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stores in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011-1022.

Tang, E., Huang, M. & Lim, L. (2003). Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 265, 103-114.

Valenzuela, C., Abugoch, L. & Tapia, C. (2013). Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. *LWT- Food Science and Technology*, 50, 531-537.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & Van Kan, J. (2007). Pathogen profile: *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-580.

Yien, L., Mohamad, N., Sarwar, A. & Katas, H. (2012). Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Physical Properties. *International Journal of BioMaterials*, 2012. 1-9.