




Transformación y agroindustria

Artículo de investigación científica y tecnológica

# Síntesis de nanoencapsulados de quitosano como sistemas portadores de fitosanitarios

Synthesis of chitosan nano-encapsulates as a carrier system for phytosanitary products

 Juliana M. Orjuela-Palacio<sup>1,2,\*</sup>  John Pérez-Calderón<sup>1,2</sup>  
 Noemí E. Zaritzky<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

\*Autor de correspondencia: Juliana M. Orjuela-Palacio, Juliana M. Orjuela-Palacio, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). Calle 47 esquina 116, La Plata, Buenos Aires, Argentina. CP: 1900, juliana.orjuela@ing.unlp.edu.ar

Recibido: 29 de noviembre de 2021  
Aprobado: 28 de octubre de 2022  
Publicado: 11 de enero de 2023

Editor temático: Angélica Piedad Sandoval, Universidad del Tolima, Tolima, Colombia.

Para citar este artículo: Orjuela-Palacio, J. M., Pérez-Calderón, J., & Zaritzky, N. E. (2023). Síntesis de nanoencapsulados de quitosano como sistemas portadores de fitosanitarios. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*,

**Resumen:** La alicina (All) es un bioactivo con actividad antimicrobiana, antioxidante y de alta efectividad en el control de insectos y el quitosano (Qs) forma nanoencapsulados al interactuar con tripolifosfato de sodio (TPP), por lo que al pensar en la síntesis de nanoencapsulados como sistemas portadores de All con efectos fitosanitarios es de interés agroindustrial. Por lo anterior, en este estudio se sintetizaron y caracterizaron nanoencapsulados de All (NQsAll) mediante la técnica de gelificación ionotrópica. La síntesis consistió en: (i) formulación de complejos All:Qs en proporción de 0,2 g de All por 1 g Qs, partiendo de una solución de Qs (1% p/v) y un fitosanitario comercial con concentración de All = 0,6 % p/v; (ii) obtención de los sistemas NQsAll partiendo de All:Qs adicionando TPP (0,06 % p/v). Se evaluaron dos relaciones en masa de TPP:Qs (5:1 y 3:1) y por medio de FTIR-ATR se observaron las bandas correspondientes a los grupos sulfóxidos (1119 cm<sup>-1</sup>), la vibración de estiramiento de las aminas primarias vinculadas a All (1072 cm<sup>-1</sup>), se comprobó la interacción electrostática de TPP:Qs y se determinó el diámetro medio de partícula (DM) y el potencial-Z (PZ) de los sistemas. La relación TPP:Qs influye significativamente, siendo NQsAll (5:1) la que presentó una mejor estabilidad y un menor tamaño (PZ = 0,67 mV; DM = 144,6 nm). Se evaluó el porcentaje de inhibición del radical DPPH• comprobando que la nanoencapsulación preservó la capacidad antioxidante. Así, NQsAll (5:1) mostró el mejor desempeño para formular un sistema nanoportador. Estos sistemas son una buena alternativa para la conservación de All e incrementan la dispersión y la humectabilidad durante la aplicación en el cultivo.

**Palabras clave:** alicina, biopolímeros, capacidad antioxidante, gelificación ionotrópica, tamaño de la partícula.

**Abstract:** Allicin is an active compound with antimicrobial activity, antioxidants and is highly effective against insects. Chitosan (Qs) is a polycationic biopolymer that forms nanoencapsulates by interacting with sodium tripolyphosphate (TPP). The synthesis of nanoencapsulates as Allicin carrier systems with phytosanitary effects is of interest to the agricultural field. Therefore, in this study nanoencapsulates were synthesized by Ionotropic gelation and then were characterized. The synthesis consists in: i) Formulation of All:Qs complexes that contain 0.2 g of All per 1 g Qs, using Qs (1%w/v) and a commercial phytosanitary with All concentration of 0.6% w/v. (ii) Obtaining the NQsAll systems using the ionotropic gelation technique by adding TPP (0.6 mg mL) to the All:Qs complex in two proportions NQsAll (5:1) and (3:1). FTIR-ATR spectra were obtained, observing the bands corresponding to the sulfoxide groups (1119 cm<sup>-1</sup>) and to the stretching vibration of the primary amines (1072 cm<sup>-1</sup>) linked to All. The electrostatic interaction of the amino groups of Qs with TPP was checked. The mean particle diameter (Dm) by dynamic light distribution and Z-Potential (PZ) were determined; TPP:Qs ratio significantly influenced, being NQsAll(5:1) the most stable, showing the smallest size (PZ=0,67 mV Dm=144.6±6.4 nm). The antioxidant capacity was evaluated by the percentage of inhibition of DPPH•; results indicated that nanoencapsulation preserved the antioxidant capacity of the complex. NQsAll(5:1) showed the best performance to formulate a nano-carrier for a phytosanitary compound. These nano-carrier systems can be a helpful alternative for the conservation of allicin; increase dispersion and wettability during crop application.

**Keywords:** Allicin, Antioxidant capacity, Biopolymers, Ionotropic gelation, Particle diameter.



24(1), e2823.  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol24\\_num1\\_art:2823](https://doi.org/10.21930/rcta.vol24_num1_art:2823)

## Introducción

El ajo (*Allium sativum* L.) es reconocido por sus aplicaciones medicinales y alelopáticas debido a los compuestos de azufre, tales como disulfuro de dialilo, alilmetilo, dialilo, dialiltrisulfuro, alilmetiltrisulfuro, etc.; estos compuestos son los responsables de las características aromáticas (Pirak et al., 2012, Chalar Vargas et al., 2014).

La alicina (dialil tiosulfonato) es el principal compuesto bioactivo y representa entre un 70 % y 80 % de los compuestos azufrados presentes en el ajo (Amagase et al., 2001; Lawson et al., 2001) y esta se forma a partir de la acción enzimática de las alinasas sobre la aliína (Santhosha et al., 2013). Este compuesto azufrado presenta diversas aplicaciones de interés debido a sus características antimicrobianas y antifúngicas (Pirak et al., 2012), actuando como un potente inhibidor de enzimas como las proteinasas de cisteína y alcohol deshidrogenasas, responsables de las infecciones causadas por bacterias, hongos o virus (Figuroa-López et al., 2014). También se ha reportado su aplicación como inhibidor natural de hongos para el almacenamiento de alimentos para los camarones (Jaramillo, 2019), la incorporación de la alicina en geles para generar la preservación de la actividad antimicrobiana del bioactivo (Tantawan & Jantawat, 2012) e incluso su aplicación como agente microbicida en la supervivencia de ratas Wistar con sepsis abdominal (Arias et al., 2017).

La alicina es un agente antibacteriano natural contra la *Escherichia coli* O157:H7, el *Staphylococcus aureus* y la *Salmonella* Typhi (Pirak et al., 2012) y además se ha reportado un alto poder inhibitorio contra *Listeria* spp. (Kim et al., 2007; Pinilla et al., 2017). Además, Rasul Suleria et al. (2011) indicaron que este compuesto bioactivo también presenta actividad antioxidante.

Los compuestos organosulfurados del ajo, entre ellos la alicina, tienen la capacidad de captar radicales libres y regular la actividad de varias enzimas antioxidantes celulares; asimismo, pueden aumentar las actividades de enzimas como son la catalasa, el superóxido dismutasa y el glutatión peroxidasa, implicadas en la eliminación de radicales libres de oxígeno (ROS) (Moya Salvador, 2020).

Por otra parte, la alicina tiene efectos antioxidantes sobre la oxidación de los tioles proteicos y la interacción con el sistema de glutatión reducido y forma S-alil-mercapto glutatión, compuesto con efectos antioxidantes a largo plazo (Mocayar Marón et al., 2020).

Por último, se conoce que la alicina es usada como un potente agente preventivo en el control biológico de aves e insectos en cultivos como homópteros, lepidópteros, hemípteros, coleópteros, acáridos y ortópteros; este biocompuesto es absorbido a través del sistema vascular vegetal de las plantas, lo cual altera el sistema enzimático de la misma y esto conduce a un enmascaramiento de las feromonas producidas por los insectos, lo que disminuye la natalidad de estos (HMA 4, s. f.).

Las características mencionadas hacen de la alicina un bioactivo de interés para el desarrollo de insumos agrícolas sustentables, no tóxicos y biodegradables, sin embargo, este biocompuesto es

termosensible, se degrada por exposición a altas temperaturas y pierde su actividad biológica (Wang et al., 2018; Lawson & Hunsaker, 2018; Tavares & Noreña, 2019). Una alternativa para preservar el bioactivo es el diseño de diferentes tipos de nanosistemas portadores que, a su vez, mejoren la dosificación y la eficiencia del principio activo en su aplicación. Varias técnicas de encapsulación tales como la coacervación (Tavares & Noreña, 2019), la generación de liposomas (Barreto Pinilla et al., 2017) y la formación de complejos con ciclodextrinas (Bai et al., 2010), entre otros, han sido aplicadas con el fin de proteger los compuestos bioactivos del ajo como la alicina, además de enmascarar su olor característico (Tavares & Noreña, 2019).

El quitosano (Qs) es un biopolímero catiónico lineal de aminopolisacáridos; es la forma N-desacetilada de la quitina que se puede obtener a partir de residuos de la industria pesquera; posee capacidad antimicrobiana, baja toxicidad y biodegradabilidad, con aplicaciones en el sector agrícola (Mármol et al., 2011; Pirak et al., 2012). Por otro lado, el efecto antimicrobiano en bacterias difiere entre las bacterias grampositivas y gramnegativas (Valencia, 2015) debido a las características de la superficie celular (Kong et al., 2010). En las bacterias gramnegativas, el mecanismo de acción del quitosano puede deberse a la interacción con los cationes de los compuestos lipopolisacáridos presentes en la membrana externa, logrando desestabilizarla. Por otro lado, en las bacterias grampositivas se presentan polímeros con carga negativa, tales como el ácido lipoteicoico y peptidoglicanos en sus estructuras externas, los cuales pueden interactuar con el quitosano a través de los grupos  $-NH^{3+}$  (Kong et al., 2010; Valencia, 2015).

El control de enfermedades y plagas que afectan las plantas es efectivo y sus mecanismos de acción están asociados a su estructura química, por lo que pueden actuar sobre el organismo patógeno o inducir mecanismos defensivos en las plantas contra varias enfermedades vegetales antes y después de la cosecha (Velásquez, 2006).

En un artículo del 2017, se ha reportado la aplicación de nanopartículas de quitosano (1000-5000 ppm, masa molecular 161-810 kDa, GD: 75-90 %) con efectos contra *Fusarium graminearum*, el agente causante del tizón de la cabeza por *Fusarium* sp. en trigo (Kheiri et al., 2017). También se comprobó la capacidad de suprimir el crecimiento del nematodo *Heterodera glycines* en la soja (Mwaheb et al., 2017). Por otra parte, favorece el crecimiento y el desarrollo de microorganismos beneficiosos e incrementa la población y la actividad microbiana en el suelo, lo que mejora la disposición de nutrientes y sus propiedades. Además, actúa como regulador del crecimiento, acelerando la germinación de las semillas, el vigor de las plantas y el rendimiento agrícola (Mármol et al., 2011).

En las plantas, los nanoencapsulados formulados con quitosano se utilizan para la protección de diferentes compuestos de interés agrícola como herbicidas, fertilizantes y fungicidas, protegiéndolos contra el medio fisiológico que deteriora el principio activo y permitiendo su liberación controlada (Choudhary et al., 2019; Valderrama et al., 2020).

Una técnica aplicada para obtener nanoencapsulados es la reticulación iónica, la cual permite formar partículas mediante una rápida reacción de reticulación entre el quitosano, el cual actúa como agente policatiónico y contraiones aniónicos multivalentes (Desbrieres et al., 2019). Las partículas sintetizadas a partir de estas reacciones se forman debido a la interacción iónica entre los grupos aminos cargados positivamente del quitosano y las moléculas cargadas aniónicamente.

El tripolifosfato de sodio (TPP) es el reticulante iónico más común utilizado para preparar sistemas de partículas a base de quitosano. Es un polianión que interactúa con el quitosano catiónico mediante fuerzas electrostáticas (Ferrari et al., 2012) y debido a la complejación entre especies con carga opuesta, el quitosano experimenta una gelificación iónica y consecuentemente se precipita para formar partículas.

El estudio de la formación de nanopartículas de quitosano es de importancia agrícola y se ha reportado el incremento en la acción biológica de este biopolímero cuando este se encuentra en soluciones de nanopartículas (Qi et al., 2004; Du et al., 2008; Huang et al., 2009). Se han descrito algunas aplicaciones de sistemas portadores nanoencapsulados con base en quitosano para diferentes aplicaciones agrícolas, tales como el recubrimiento de semillas para la liberación controlada de fertilizantes, mostrando una potente acción bactericida y fungicida (Velásquez, 2006; Mármol et al., 2012).

El objetivo del presente trabajo consistió en sintetizar y caracterizar sistemas nanoencapsulados de quitosano como sistemas portadores del compuesto bioactivo alicina presente en un fitosanitario comercial, para esto, se generó un complejo entre el quitosano y el compuesto bioactivo que contiene alicina y se sintetizó un sistema nanoencapsulado del complejo alicina-quitosano mediante la técnica de gelificación ionotrópica usando tripolifosfato de sodio. Luego, se estudió el efecto de la variación en la relación entre tripolifosfato de sodio y quitosano presentes en la reacción, mediante la caracterización estructural (FTIR-ATR) y fisicoquímica (determinación de tamaño medio de partícula, potencial Z) y además se evaluó la actividad antioxidante mediante el ensayo de inhibición del radical DPPH•.

La aplicación del proceso de reticulación iónica y la variación de la relación TPP:Qs permiten la síntesis de nanoencapsulados del fitosanitario, cuyo compuesto bioactivo es la alicina, en una matriz de quitosano como sistema nanoportador.

## **Materiales y métodos**

### **Formación del complejo alicina-quitosano**

Se obtuvieron complejos alicina-quitosano (All-Qs) adaptando el protocolo propuesto por Pirak et al. (2012), a partir del producto fitosanitario “VG GUARD” (HMA 4, s. f.), cuyo componente principal y activo es la alicina en una concentración de 0,6 % p/v y soluciones de quitosano Qs; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El quitosano empleado fue caracterizado fisicoquímicamente y su peso molecular fue de  $2,83 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>, obtenido por el método viscométrico utilizando un viscosímetro capilar de Ostwald. El grado de desacetilación del quitosano fue del 75,3 % (SD = 1,1), determinado por el método FTIR (Brugnerotto et al., 2001) y del 79,5 % (SD = 2,7) determinado por la valoración potenciométrica (Broussignac, 1968).

Se realizaron mezclas con una proporción de 0,2 g de alicina por 1 g de Qs, partiendo de una solución Qs (1 % p/v) preparada en medio ácido (ácido acético glacial (1 % v/v) y el fitosanitario comercial con 0,6 % p/v de alicina; la dispersión formada se sometió a agitación constante de

100 rpm y 30 °C, con tiempo de agitación de 24 horas. Las mezclas obtenidas se dejaron reposar a 4 °C durante 48 h y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, con el fin de retirar la fracción insoluble aportada por el fitosanitario, siendo el sobrenadante el complejo All-Qs formado, el cual fue recuperado para ser usado en la etapa de reticulación.

Para la obtención de los sistemas NQsAll, partiendo de All:Qs, se adicionó por goteo TPP (0,06 % p/v) en dos relaciones de masa de TPP:Qs (5:1 y 3:1), con agitación constante durante 5 s a 100 rpm usando un agitador Velp Classic (Velp Scientifica). Finalizada la adición de la solución de TPP, se llevaron las muestras a agitación durante 90 minutos a una velocidad de agitación de 100 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y el precipitado se congeló a -40 °C por 24 h previo al secado por liofilización (temperatura = -50 °C; presión = 001 Torr, 48 h) en un equipo HETO Modelo FD 4 y se almacenaron a 4 °C hasta su caracterización.

### **Caracterización de las muestras**

#### ***Determinación de sólidos solubles totales (SST; ° Brix) y pH***

El contenido de SST de los complejos de Qs-All formados y en solución se determinó con un refractómetro manual Atago N<sub>2</sub> (Tokio, Japón) y las determinaciones se hicieron por triplicado. El pH de las muestras de los complejos de Qs-All formados y en solución se midió con un peachímetro Hach Sension+ pH3 Lab (Hach Company, Estados Unidos) a 25 °C. Finalmente, las mediciones se hicieron por duplicado.

#### **Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y reflectancia total atenuada (ATR)**

Los espectros FTIR del quitosano, la alicina presente en el fitosanitario liofilizado y de los nanoencapsulados alicina-quitosano liofilizados obtenidos, se registraron con un espectrómetro Nicolet IS10 (Thermo- Scientific, Estados Unidos) con accesorio de ATR (diamante).

Se trabajó en un rango de números de onda desde 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> y para cada muestra se colectaron 60 barridos con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> que fueron acumulados. Los datos obtenidos se procesaron utilizando el *software* OMNIC TM de Thermo Scientific TM.

#### **Distribución de tamaño de partícula de los complejos All-Qs**

Para la evaluación de la distribución del tamaño de los encapsulados All-Qs con diferentes relaciones de TPP:Qs, las muestras en solución se sonicaron durante 60 s usando una punta homogeneizadora ultrasónica OMIN Sonic Ruptor 400, seguido de una dilución 1:10 previa a medición. Las medidas se realizaron en un equipo Nanoparticle Analyzer SZ-100-Z (Horiba Instruments, Japón), provisto de un diodo láser JUNO, modelo 10G-HO (Showa Optronics, Japón) operado a 532 nm, usando una cubeta de cuarzo.

#### **Determinación del potencial-Z (PZ)**

La medida del potencial-Z (PZ) consiste en determinar la carga en la superficie externa de una partícula en suspensión (coloide, nanopartícula, etc.), basándose en la teoría de la doble capa eléctrica; permite conocer el comportamiento de la partícula por medio de la movilidad electroforética que experimenta la partícula en suspensión en un campo eléctrico definido, ya que indica el balance entre los cambios en el potencial de la superficie de dicha partícula y las fuerzas de repulsión en su entorno.

Se tomó 1 ml de la suspensión y se mezcló con 0,25 ml de una solución de cloruro de potasio (KCl; 1 mM), con el propósito de ajustar la conductividad eléctrica del medio. Se midió el PZ utilizando un Nanoparticle Analyzer SZ-100-Z (Horiba Instruments, Japón), provisto de un diodo láser JUNO, modelo 10G-HO (Showa Optronics, Japón) operado a 532 nm usando una celda con electrodo de carbono de 6 mm; los datos reportados comprenden el promedio de tres mediciones.

### ***Capacidad de inhibición de las nanopartículas del complejo All/Qs: inhibición del radical DPPH•. (%I)***

Se determinó la capacidad antioxidante del quitosano, la alicina presente en el fitosanitario y los nanoencapsulados de All:Qs mediante la inhibición del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH•) en una solución etanólica, siguiendo la metodología propuesta por Brand Williams et al. (1995). El método DPPH• determina actividades de captura de material radicalario en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso. La forma estable del DPPH• (violeta) absorbe a una longitud de onda de 517 nm, al ser reducido por un compuesto con actividad antioxidante (AH) u otra especie radical (R•), la absorción disminuye (amarillo), representando la capacidad antioxidante total del compuesto ensayado.

Para la medición de los antioxidantes se preparó una solución de quitosano al 0,2 % p/v y una dilución del fitosanitario con agua destilada para alcanzar una concentración de alicina de 0,04 % p/v, con el fin de equiparar las concentraciones en el complejo All:Qs (previo a la liofilización). Los nanoencapsulados liofilizados se resuspendieron en agua destilada para equiparar la relación de 0,2 g de alicina cada un (1) g de quitosano. Las muestras se agitaron a 100 rpm, a 20 °C y oscuridad durante 1 h, y finalmente se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y el sobrenadante se reservó a 4 °C y oscuridad hasta su medición.

La técnica aplicada consistió en mezclar una alícuota (0,1 ml) de la muestra con 3,9 ml de la solución DPPH•-etanol (25 mg DPPH•/l) y almacenar en oscuridad. El curso de la reacción se siguió determinando la caída de la absorbancia a 517 nm con un tiempo de reacción de 150 minutos en un equipo espectrofotómetro UV mini-1240 UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Japón). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (% I), ecuación 1:

$$\% I = \frac{Abs_b - Abs_m}{Abs_b} * 100 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde,  $Abs_b$  es la absorbancia del blanco (solución del radical DPPH•-etanol) y  $Abs_m$  es la

absorbancia medida para la muestra analizada, evaluadas a 150 min.

### **Análisis estadístico**

Se realizaron análisis estadísticos utilizando el *software* Infostat v. 2013 (InfoStat Group, 2016). La prueba t se aplicó para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de los resultados correspondientes a la comparación de diámetros medios y potencial Z para dos relaciones TPP:Qs. El análisis de varianza (**Anova**) se utilizó para establecer diferencias estadísticamente significativas entre las medias, los resultados de la capacidad antioxidante fueron determinados por el método DPPH• (%I) en cinco grupos de muestras, donde las diferencias se compararon mediante la prueba de Tukey usando un nivel de significancia  $p < 0,05$ .

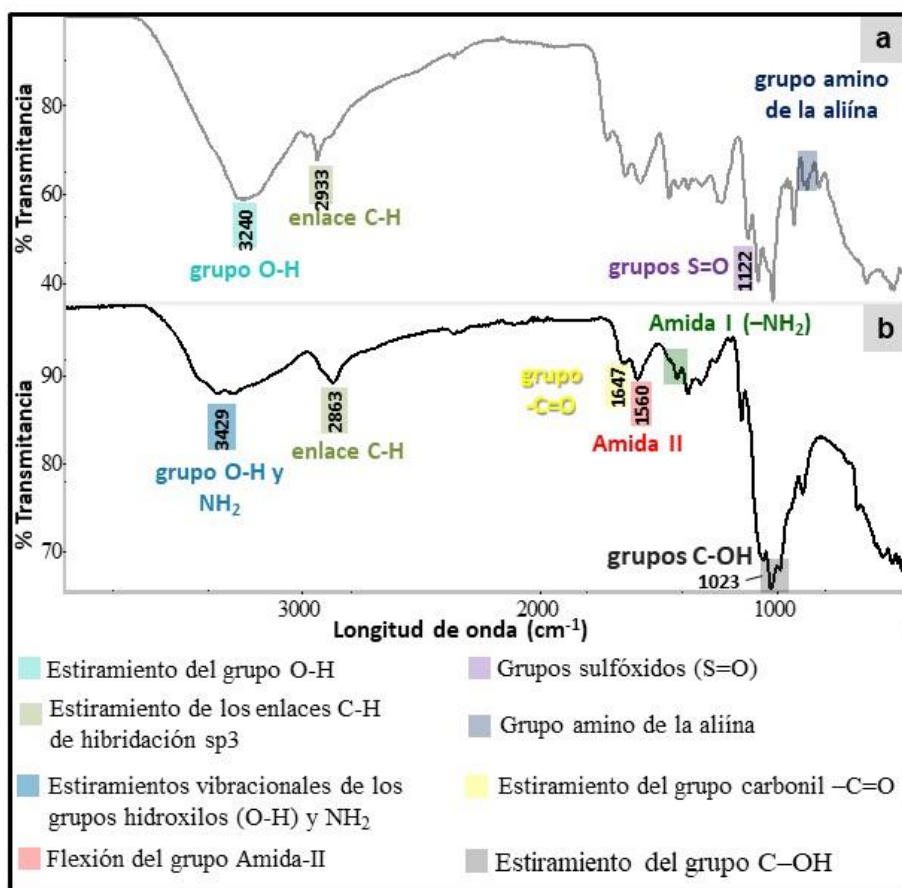
### **Resultados y discusión**

Se obtuvieron complejos All-Qs a partir de soluciones de quitosano de concentración 1 % p/v y el fitosanitario “VG GUARD”, mediante la reticulación iónica con tripolifosfato de sodio (TPP) con un contenido de sólidos solubles totales de  $2,44 \pm 0,01$  °Brix.

Los complejos All-Qs nanoencapsulados se llevaron a cabo por medio de la interacción del quitosano y el TPP, donde este último se puede presentar en diferentes especies aniónicas dependientes al pH:  $P_3O_{10}^{-5}$ ,  $HP_3O_{10}^{-4}$  y  $H_2P_3O_{10}^{-3}$ . Una solución acuosa de TPP presenta pH = 9, disociándose mayoritariamente en iones  $P_3O_{10}^{-5}$ , los cuales consecutivamente tienden a formar iones  $HP_3O_{10}^{-4}$  y  $OH^-$ .

El proceso de reticulación iónica entre el quitosano y el TPP se genera cuando entra en contacto la solución de quitosano con la solución del TPP. Debido a las condiciones de solubilización del quitosano, esta solución se encontraba a pH ácido (2,98), por lo cual los grupos aminos de este biopolímero estaban protonados ( $NH_3^+$ ); por esta razón, los iones  $P_3O_{10}^{-5}$ ,  $HP_3O_{10}^{-4}$  y  $OH^-$  compiten para reaccionar electrostáticamente con los  $NH_3^+$  (Bhumkar & Pokharkar, 2006). El pH de las suspensiones de las nanopartículas fue de 3,5 y el incremento del pH indicó que el proceso de reticulación iónica se produce con la neutralización de cargas.

La caracterización estructural del quitosano, la alicina presente en el fitosanitario y los sistemas nanoencapsulados (NQsAll (5:1) y All-Qs NQsAll (3:1)) se realizó mediante FTIR-ATR. En la figura 1 se presentan los espectros de la alicina (presente en el fitosanitario) (a) y el quitosano (b). En el espectro “a” la alicina (figura 1a) se observó un pico correspondiente a la longitud de onda  $3240\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento del grupo O-H y a  $2933\text{ cm}^{-1}$ , un pico correspondiente al estiramiento de los enlaces C-H de hibridación  $sp^3$  (Figuroa-López et al., 2014). Las bandas observadas a 1122 y 1078 podrían corresponder a los grupos sulfóxidos (S = O) y a la vibración de estiramiento de las aminas primarias C-N, reportadas por Figuroa-López et al. (2014) para 1130 y 1107  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, las cuales se atribuyen a la alicina y sus productos derivados. El pico observado a  $926\text{ cm}^{-1}$  podría corresponder a la deformación de  $=CH_2$ , y el pico  $820\text{ cm}^{-1}$  a aminas primarias N-H, los cuales se deben al grupo amino de la alicina (Figuroa-López et al., 2014).



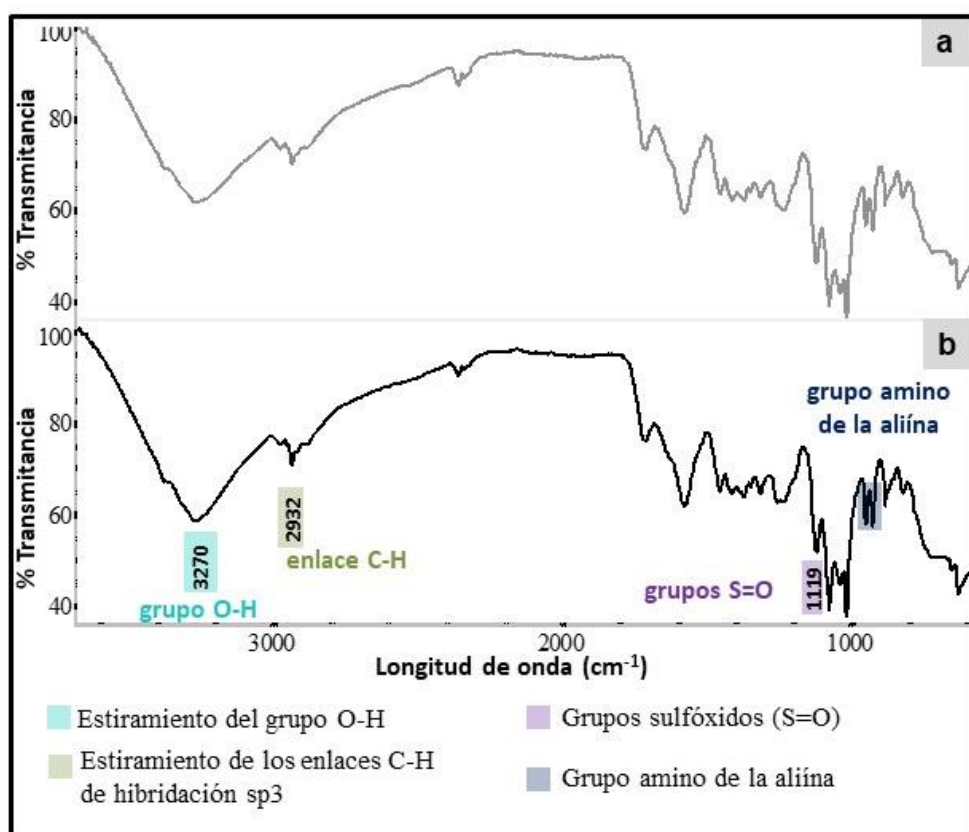
**Figura 1.** Espectros FTIR: a) Alicina presente en el fitosanitario y b) Quitosano.  
 Nota: Las marcaciones en el espectro resaltan algunos grupos funcionales de interés.  
 Fuente: Elaboración propia.

En la figura 1b se presenta el espectro FTIR de quitosano en polvo, donde se observó la presencia de la banda ancha ubicada en 3429 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los picos combinados de los estiramientos vibracionales de los grupos hidroxilos (O-H) y NH<sub>2</sub> (Qi et al., 2004), la banda en 2933 cm<sup>-1</sup> corresponde a una vibración de tensión del enlace C-H, (Sierra et al., 2013); la banda 1647 cm<sup>-1</sup> se atribuye al estiramiento del grupo carbonil -C = O y a 1560 cm<sup>-1</sup> se presentó el pico correspondiente a la flexión del grupo amida-II, la cual se solapa con la flexión del grupo amino en 1549 cm<sup>-1</sup> (Liu & Zhang, 2015; Tirtom et al., 2012), a 1413 cm<sup>-1</sup> grupo amida I (-NH<sub>2</sub>) y 1358 cm<sup>-1</sup>, donde se produce la vibración de flexión simétrica a modo “tijera” del grupo amida I a 1150 cm<sup>-1</sup> con vibración de flexión asimétrica C-O-C y a 1023 cm<sup>-1</sup>, con las bandas correspondientes a las vibración que involucran el estiramiento del grupo alcohólico C-OH, características de los polisacáridos (Kim et al., 2012; Kyzas et al., 2008).

En la figura 2 se presentan los espectros FTIR de los nanoencapsulados quitosano/alicina: a) NQsAll (3:1). y b) NQsAll (5:1). La formación del complejo All-Qs se podría evidenciar en la zona de 1500 a 500 cm<sup>-1</sup>, donde se observan las bandas correspondientes a los grupos sulfóxidos

S = O ( $1119\text{ cm}^{-1}$ ) y a la vibración de estiramiento de las aminas primarias C-N ( $1072\text{ cm}^{-1}$ ), observadas en el espectro FTIR de la alicina (figura 1a).

El pico observado a  $926\text{ cm}^{-1}$  podría corresponder a la deformación de  $=\text{CH}_2$ , y el pico  $820\text{ cm}^{-1}$  a de aminas primarias N-H, lo cual se debe al grupo amino de la aliina (Figuroa-López et al., 2014). En comparación con el espectro del quitosano (figura 2b), el complejo All-Qs presentó un corrimiento del pico de la flexión del grupo amida-II, que originalmente se presenta para el Qs a  $1560\text{ cm}^{-1}$  y que se observó en el complejo a  $1575\text{ cm}^{-1}$ , esto se presenta por la interacción electrostática de los grupos aminos libres del quitosano con los iones del TPP, asimismo, la disminución de las intensidades de la banda a  $1647\text{ cm}^{-1}$ . También se presentan dos nuevas bandas a  $1712\text{ cm}^{-1}$  y  $1575\text{ cm}^{-1}$ , que indican el entrecruzamiento con las moléculas de TPP (Qi et al., 2004) durante la reticulación iónica.



**Figura 2.** Espectros FTIR de los nanoencapsulados : a) NQsAll (3:1) y b) NQsAll (5:1).

Nota: Las marcaciones en el espectro resaltan algunos grupos funcionales de interés.

Fuente: Elaboración propia.

### Distribución del tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y PZ de los nanoencapsulados All-Qs

En la tabla 1 y la figura 3 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación del tamaño de partícula de los nanoencapsulados alicina-quitosano para dos relaciones TPP:Qs. Se observó que

la relación TPP:Qs influye significativamente ( $p < 0,05$ ) en la distribución del tamaño de las partículas de los nanoencapsulados All-Qs.

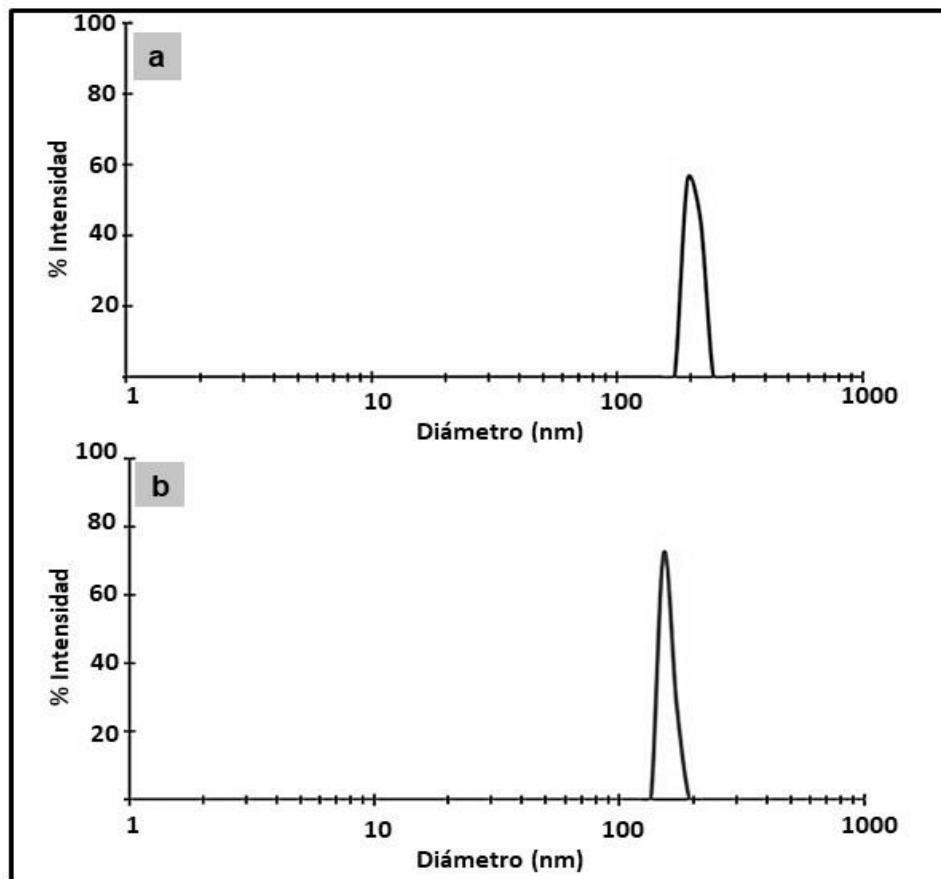
**Tabla 1.** Distribución de tamaño de partícula obtenidos por distribución de luz dinámica (DSL) y PZ de NQsAll (3:1) y NQsAll (5:1)

NQsAll (TPP:Qs)	Distribución del diámetro medio (nm)*	Tipo de distribución	PZ (mV)
3:1	$165,0 \pm 3,1^a$	Polidisperso	$2,56 \pm 0,63^a$
5:1	$144,6 \pm 6,4^b$		$0,67 \pm 0,06^b$

\*Resultados expresados como el promedio de 3 lecturas  $\pm$  desviación estándar.

Los valores con superíndices distintos difieren significativamente por tratamiento (<sup>a,b</sup>) la prueba t ( $\alpha = 0,05$ ).

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.** Distribución de tamaño de partícula de los complejos a) NQsAll (3:1) y b) NQsAll (5:1).

Fuente: Elaboración propia.

La menor relación de TPP:Qs llevó a la formación de nanopartículas de mayor tamaño (figura 3a), esto se atribuye a que cuando se agrega una menor proporción del reticulante queda un alto número de cargas positivas en el Qs sin neutralizar, lo cual genera repulsión entre las cadenas del biopolímero y mayores tamaños de las partículas; asimismo se observan mayores valores de PZ.

La formación de los sistemas nanoencapsulados NQsAll se llevó a cabo usando Qs y TPP, ambos compuestos se caracterizan por tener diferentes cargas, siendo positivas para el Qs y negativas para el TPP. El PZ de las soluciones de Qs y TPP usadas para el proceso de reticulación fueron  $35,03 \pm 0,12$  mV y  $-2,37 \pm 0,25$  mV, respectivamente. Este resultado muestra las características iónicas de cada uno de los compuestos, donde se comprobó que el PZ para el Qs fue positivo al tratarse de un polielectrolito catiónico, caso contrario fue el del TPP. Para el caso del complejo All:Qs, el PZ fue  $17,20 \pm 10,7$  mV, esto demuestra que existió una reducción del PZ en comparación al del Qs debido a la interacción electrostática entre este policationico y la All presente en el fitosanitario.

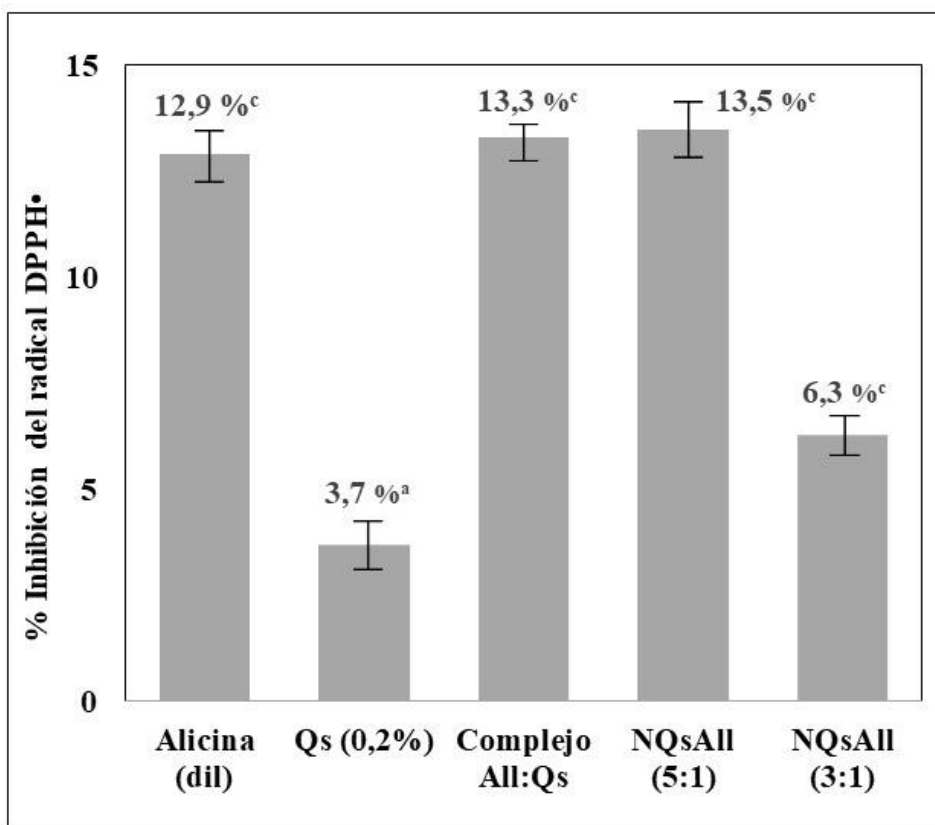
Se observa una diferencia significativa (tabla 1;  $p < 0,05$ ) en los de los PZ nanoencapsulados, siendo  $0,67 \pm 0,06$  mV para la relación 5:1, valor cercano a 0 por causa de la falta de repulsión de las cargas indicando la neutralización electrostática; este fenómeno generó un sistema insoluble que correspondió a las nanopartículas, en concordancia con varios autores (Souza et al., 2012 y Tavares & Noreña, 2019); y para la relación 3:1, un PZ de  $2,56 \pm 0,63$  mV, en este caso el PZ de las nanopartículas formuladas con este biopolímero tiende a ser positivo indicando la presencia de grupos aminos superficiales (Jonassen et al., 2012).

### **Capacidad de inhibición del radical DPPH• (% I) por el complejo de nanopartículas All/Qs**

Se determinó la capacidad antioxidante de la alicina, la solución de quitosano (Qs 1 % p/v) y los nanocomplejos NQsAll (5:1) y NQsAll (3:1) (figura 4).

El posible mecanismo de acción del compuesto activo es su participación como donante de hidrógeno o electrones, reduciendo el radical DPPH• a su forma DPPH (Bozin et al., 2008).

Los porcentajes de inhibición (% I) obtenidos fueron en todos los casos inferiores al 15 %, la dilución de alicina (0,004 % p/v) y el quitosano (0,2 % p/v) presentaron valores de 12,9 % y 3,7 % de inhibición, respectivamente, evidenciando que la actividad antioxidante está dada principalmente por el compuesto activo: alicina. Diversos autores han reportado la capacidad antioxidante para extractos de ajo, Rasul Suleria et al., (2011) indicaron porcentajes de inhibición medidos mediante DPPH\* para extractos acuosos y metanólicos de 73,80 % y 83,83 %, respectivamente; por otra parte, González Ramírez (2019) reportó un 11,99 % de inhibición para muestras de ajo fresco. Cabe recordar que el contenido de alicina reportado en ajo fresco es de 345 mg cada 100 g de ajo (Jeong et al., 2016).



**Figura 4.** Capacidad antioxidante medida mediante la inhibición del radical DPPH• (%I) a 517 nm.

Notas: Dilución de alicina (0,04 % p/v), la solución de quitosano al 0,2 %, el complejo All:Qs previo a la liofilización y los nanoencapsulados de NQsAll (5:1) y NQsAll (3:1). Los valores con superíndices distintos (a, b, c) difieren significativamente por tratamiento la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fuente: Elaboración propia.

La capacidad de inhibición del radical DPPH• del complejo All/Qs (prelioofilización) y NQsAll (5:1) no presenta diferencias significativas (figura 4;  $p > 0,05$ ) con respecto al % I de la dilución del fitosanitario (0,004 % p/v), indicando que los procesos de reticulación y nanoencapsulado permiten conservar las propiedades antioxidantes del complejo en solución, asimismo, el empleo del secado por liofilización contribuye a la conservación del compuesto bioactivo. Tavares y Noreña (2019) demostraron la actividad antioxidante de encapsulados de extracto de ajo en micropartículas de quitosano y aislado de proteínas de suero de leche, obtenidos por coacervación mediante secado por atomización o liofilización; en este ensayo, las micropartículas presentaron una buena capacidad antioxidante aunque menor que en el extracto de ajo sin encapsular y observaron que la actividad también descendió con el secado por atomización en comparación a la liofilización, debido a las temperaturas del proceso de secado.

La capacidad de inhibición del complejo NQsAll (3:1) se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) como se muestra en la figura 4, indicando que la relación 3:1 presenta una menor capacidad de estabilización del principio activo de la alicina.

## Conclusiones

Mediante el proceso de reticulación iónica se logró la síntesis de nanoencapsulados del compuesto bioactivo alicina presente en el fitosanitario comercial, en una matriz de quitosano como sistema nanoportador. La formación de los nanoencapsulados se comprobó mediante la caracterización estructural por FTIR, donde se observaron bandas características correspondientes a la alicina, además de señales asociadas a la interacción electrostática entre los grupos aminos libres del quitosano y el tripolifosfato de sodio (TPP), indicando la reticulación entre las moléculas.

La relación TPP:Qs influyó en la distribución del tamaño de las partículas, el PZ y la capacidad antioxidante del nanocomplejo All-Qs formado, siendo la relación TPP:Qs (5:1) la que presentó un menor tamaño de nanopartículas y las mejores características para formular un sistema nanoportador.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de La Plata, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por la financiación del proyecto.

## Contribución de los autores

Orjuela-Palacio, Juliana: diseño y elaboración del proyecto, metodología, recopilación y análisis de datos, escritura del manuscrito, edición. Pérez-Calderón, John: diseño y elaboración del proyecto, metodología, recopilación y análisis de datos, escritura del manuscrito, edición. Zaritzky Noemí: diseño y elaboración del proyecto, metodología, análisis de datos, escritura del manuscrito y edición. Directora del proyecto y financiación.

## Implicaciones éticas

No existen implicaciones éticas en el desarrollo de este estudio.

## Conflicto de interés

Los autores manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

## Financiación

Los autores agradecen el financiamiento proporcionado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

## Referencias

- Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of nutrition*, 131(3), 955S-962S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.3.955s>
- Arias, L. R., Fung, L. F., & Mendoza, L. R. (2017). Impacto de la alicina como agente microbicida en la sobrevida de ratas Wistar con sepsis abdominal comparado con lavado peritoneal con solución fisiológica. *Jóvenes en la ciencia*, 3, 210-214. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/2249/1745>
- Bai, Y., Yu, B., Xu, X., Jin, Z., Tian, Y., & Lu, L. (2010). Comparison of encapsulation properties of major garlic oil components by hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin. *European Food Research and Technology*, 231(4), 519-524. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1307-6>
- Barreto Pinilla, C. M., Noreña, C. P., & Brandelli, A. (2017). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. *Food Chemistry*, 220, 470-476. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.027>
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igetic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111(4), 925-929. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.071>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie Food Science and Technology*, 28(1), 25-35. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
- Broussignac, P. (1968). Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. *Chim. Ind. Genie Chim*, 99(9), 1241-1247. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- Bhumkar, D. R., & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *AAPS PharmSciTech*, 7(2), E138-E143. <https://doi.org/10.1208/pt070250>
- Chalar Vargas, L. R., Moya Mamani, J. C., Vargas Alvarez, E., Sejas Rebollo, M., & Romero, B. (2014). Función Antimicrobiana de la Alicina de Ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. *Revista Científica Ciencia Médica*, 17(1), 26-28. <https://www.redalyc.org/pdf/4260/426041228008.pdf>
- Choudhary, R. C., Kumari, S., Kumaraswamy, R. V., Sharma, G., Kumar, A., Budhwar, S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., & Saharan, V. (2019). Chitosan nanomaterials for smart delivery of bioactive compounds in agriculture. En: *Nanoscale engineering in agricultural management* (pp. 124-139). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315123950-7>

- Desbrieres, J., Peptu, C., Ochiuz, L., Savin, C., Popa, M., & Vasiliu, S. (2019). Application of chitosan-based formulations in controlled drug delivery. En: *Sustainable Agriculture Reviews* 36 (pp. 241-314). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9_7)
- Du, W. L., Xu, Y. L., Xu, Z. R., & Fan, C. L. (2008). Preparation, characterization and antibacterial properties against E. coli K88 of chitosan nanoparticle loaded copper ions. *Nanotechnology*, 19(8), 085707. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/8/085707>
- Ferrari, F., Bonferoni, M. C., Rossi, S., Sandri, G., & Caramella, C. M. (2012). Manufacture Techniques of Chitosan-Based Microparticles and Nanoparticles for Biopharmaceuticals. *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*, 137-158. <https://doi.org/10.1002/9781119962977.ch9>
- Figuerola-López, K. J., Torres Vargas, O. L., Prías-Barragán, J. J., & Ariza-Calderón, H. (2014). Optical and structural characterization of *Allium sativum* L. nanoparticles impregnate in bovine loin. *Acta Agronómica*, 64(1), 54-60. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n1.43651>
- González Ramírez, P. J. (2019). *Efecto de la humedad relativa en la variación del perfil metabólico y efecto hepatoprotector del ajo negro* [tesis de maestría]. Universidad Veracruzana, México. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/50315/GonzalezRamirezPaola.pdf?sequence=3>
- HMA 4. (s. f.). *Insumos sustentables*. <http://www.fs.com.ar/agro-fitosanitarios-naturales.html>
- Huang, L., Cheng, X., Liu, C., Xing, K., Zhang, J., Sun, G., Li, X., & Chen, X. (2009). Preparation, characterization, and antibacterial activity of oleic acid-grafted chitosan oligosaccharide nanoparticles. *Frontiers of Biology in China*, 4, 321-327. <https://doi.org/10.1007/s11515-009-0027-4>
- InfoStat Group. (2016). *InfoStat*. <http://www.infostat.com.ar>
- Jaramillo, E. (2019). *Estudio comparativo de la Alicina obtenida del ajo (Allium sativum L.) como inhibidor natural de hongo versus un inhibidor químico (Inbimold) para su uso en el almacenamiento de alimento para camarón* [tesis de grado]. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/12653/1/T-UCSG-PRE-TEC-CIA-49.pdf>
- Jeong, Y. Y., Ryu, J. H., Shin, J. H., Kang, M. J., Kang, J. R., Han, J., & Kang, D. (2016). Comparison of anti-oxidant and anti-inflammatory effects between fresh and aged black garlic extracts. *Molecules*, 21, 430. <https://doi.org/10.3390/molecules21040430>
- Jonassen, H., Kjøniksen, A. L., & Hiorth, M. (2012). Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 13(11), 3747-3756. <https://doi.org/10.1021/bm301207a>
- Kheiri, A., Moosawi Jorf, S. A., Malhipour, A., Saremi, H., & Nikkhah, M. (2017). Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and their effect on Fusarium head blight and oxidative activity in wheat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 526-538. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.034>
- Kim, J. E., Choi, N. H., & Kang, S. C. (2007). Anti-listerial properties of garlic shoot juice at growth and morphology of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(10), 1198-1203. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.017>
- Kim, T. Y., Park, S. S., & Cho, S. Y. (2012). Adsorption characteristics of Reactive Black 5 onto chitosan beads cross-linked with epichlorohydrin. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(4), 1458-1464. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.02.006>
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-

63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Kyzas, G. Z., Bikiaris, D. N., & Lazaridis, N. K. (2008). Low-swelling chitosan derivatives as biosorbents for basic dyes. *Langmuir*, 24(9), 4791-4799. <https://doi.org/10.1021/la7039064>
- Lawson, L. D., Wang, Z. J., & Papadimitriou, D. (2001). Allicin release under simulated gastrointestinal conditions from garlic powder tablets employed in clinical trials on serum cholesterol. *Planta Medica*, 67(1), 13-18. <https://doi.org/10.1055/s-2001-10624>
- Lawson, L. D., & Hunsaker, S. M. (2018). Allicin bioavailability and bioequivalence from garlic supplements and garlic foods. *Nutrients*, 10(7), 812. <https://doi.org/10.3390/nu10070812>
- Liu, X., & Zhang, L. (2015). Removal of phosphate anions using the modified chitosan beads: Adsorption kinetic, isotherm and mechanism studies. *Powder Technology*, 277, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.02.055>
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutiérrez, E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 1, 53-58. <http://revecyt.ula.ve/storage/repo/ArchivoDocumento/rtecuru/n1/art06.pdf>
- Mármol, Z., Fernández, A., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., & Aiello, C. (2012). Efecto de la quitina sobre variables relacionadas con la estabilidad en vino blanco. *Revista Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia*, 29, 624-644. [https://www.researchgate.net/profile/Cateryna-Aiello-Mazzarri/publication/289092515\\_Effect\\_of\\_chitin\\_on\\_variables\\_related\\_with\\_stability\\_in\\_white\\_wine/links/58c828adaca2723ab16b0ef4/Effect-of-chitin-on-variables-related-with-stability-in-white-wine.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Cateryna-Aiello-Mazzarri/publication/289092515_Effect_of_chitin_on_variables_related_with_stability_in_white_wine/links/58c828adaca2723ab16b0ef4/Effect-of-chitin-on-variables-related-with-stability-in-white-wine.pdf)
- Mocayar Marón, F. J., Camargo, A. B., & Manucha, W. (2020). Allicin pharmacology: Common molecular mechanisms against neuroinflammation and cardiovascular diseases. *Life Science*, 249, 117513. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117513>
- Moya Salvador, A. (2020). *Compuestos organosulfurados presentes en aliáceas y sus propiedades saludables* [tesis de maestría]. Universidad de Sevilla, Sevilla. <https://hdl.handle.net/11441/104080>
- Mwaheb, M. A., Hussain, M., Tian, J., Zhang, X., Hamid, M. I., El-Kassim, N. A., Hassan, G. M., Xiang, M., & Liu, X. (2017). Synergetic suppression of soybean cyst nematodes by chitosan and *Hirsutella minnesotensis* via the assembly of the soybean rhizosphere microbial communities. *Biological Control*, 115, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.09.011>
- Pinilla, C. M., Noreña, C. P., & Brandelli, A. (2017). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. *Food Chemistry*, 220, 470-476. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.027>
- Pirak, T., Jangchud, A., & Jantawat, P. (2012). Characterisation of physical, chemical and antimicrobial properties of allicin-chitosan complexes. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(7), 1339-1347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02978.x>
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.09.007>
- Rasul Suleria, H. A., Sadiq Butt, M., Muhammad Anjum, F., Saeed, F., Batool, R., & Nisar Ahmad, A. (2011). Aqueous garlic extract and its phytochemical profile; special reference to antioxidant status. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(4), 431-439. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.634786>

- Santhosha, S. G., Jamuna, P., & Prabhavathi, S. N. (2013). Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food bioscience*, 3, 59-74. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.07.001>
- Sierra, D. M., Orozco, C. P., Rodríguez, M. A., & Villa, W. A. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia Et Technica*, 18(1), 260-266. <https://doi.org/10.22517/23447214.7555>
- Souza, F. N., Gebara, C., Ribeiro, M. C., Chaves, K. S., Gigante, M. L., & Grosso, C. R. (2012). Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Research International*, 49(1), 560-566. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.041>
- Valderrama, A., Lay, J., Flores, Y., Zavaleta, D., & Delfin, A. R. (2020). Factorial design for preparing chitosan nanoparticles and its use for loading and controlled release of indole-3-acetic acid with effect on hydroponic lettuce crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101640. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101640>
- Valencia, G. A. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Revista Scientia Agroalimentaria*, 2. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/scientiaagro/article/view/743/579>
- Velásquez, C. L. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21. <https://www.redalyc.org/pdf/933/93310204.pdf>
- Tantawan, P., Jangchud, A., & Jantawat, P. (2012). Characterisation of physical, chemical and antimicrobial properties of allicin-chitosan complexes. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1339-1347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02978.x>
- Tavares, L., & Noreña, C. P. (2019). Encapsulation of garlic extract using complex coacervation with whey protein isolate and chitosan as wall materials followed by spray drying. *Food Hydrocolloids*, 89, 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.052>
- Tirtom, V. N., Dinçer, A., Becerik, S., Aydemir, T., & Çelik, A. (2012). Comparative adsorption of Ni(II) and Cd(II) ions on epichlorohydrin crosslinked chitosan-clay composite beads in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 197, 379-386. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.059>
- Wang, Y., Jia, J., Shao, J., Shu, X., Ren, X., Wu, B., & Yan, Z. (2018). Preservative effects of allicin microcapsules on daily foods. *LWT-Food science and Technology*, 98, 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.043>