Enrique Niza González

DESARROLLO DE UNA NUEVA NANOTECNOLOGÍA VERDE DESDE UN ENFOQUE DE ECONOMÍA CIRCULAR EN GESTIÓN DE RESIDUOS AGRICOLAS DE LA PROVINCIA DE ALBACETE

INSTITUTO DE ESTUDIOS ALBACETENSES Don Juan Manuel

DIPUTACIÓN DE ALBACETE

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

DESARROLLO DE UNA NUEVA NANOTECNOLOGÍA VERDE DESDE UN ENFOQUE DE ECONOMÍA CIRCULAR EN GESTIÓN DE RESIDUOS AGRICOLAS DE LA PROVINCIA DE ALBACETE

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Enrique Niza González

DESARROLLO DE UNA NUEVA NANOTECNOLOGÍA VERDE DESDE UN ENFOQUE DE ECONOMÍA CIRCULAR EN GESTIÓN DE RESIDUOS AGRICOLAS DE LA PROVINCIA DE ALBACETE

INSTITUTO DE ESTUDIOS ALBACETENSES
«DON JUAN MANUEL»
EXCMA. DIPUTACIÓN DE ALBACETE

Serie I - Estudios nº 293
Albacete, 2023

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Niza González, Enrique.
Desarrollo de una nueva nanotecnología verde desde un enfoque de economía circular en gestión de residuos agrícolas de la provincia de Albacete / Enrique Niza González. -- Albacete : Instituto de Estudios Albacetenses "Don Juan Manuel", 2023.
95 p. : il. ; 24 cm. -- (Serie I - Estudios ; 293)
D.L. AB 639-2023
ISBN 978-84-10056-04-6
ISBN 978-84-10056-05-3 (Libro digital)
1. Nanotecnología. 2. Residuos agrícolas-Innovaciones tecnológicas. 3. Agricultura sostenible. I. Instituto de Estudios Albacetenses "Don Juan Manuel". II. Título. III. Serie.
631.147
631.559

Premio de Estudios Jurídicos-Económicos «Melchor de Macanaz-Artemio Precioso Ugarte», 2022

CECEL
CONFEDERACIÓN ESPAÑOLA DE CENTROS DE ESTUDIOS LOCALES

INSTITUTO DE ESTUDIOS ALBACETENSES «DON JUAN MANUEL»
DIPUTACIÓN DE ALBACETE
MIEMBRO DE LA CONFEDERACIÓN ESPAÑOLA DE ESTUDIOS LOCALES. CSIC

Las opiniones, hechos o datos consignados en esta obra son de la exclusiva responsabilidad del autor

Cubierta: Enrique Niza González
© De las imágenes y los textos: Enrique Niza González
Maquetación e impresión: DESONORA
D.L.: AB 639-2023
ISBN: 978-84-10056-04-6
ISBN: 978-84-10056-05-3 (Libro digital)
DOI: http://doi.org/10.37927/978-84-10056-05-3

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

A mi Ciudad, a mi provincia, al Mundo,
a mi familia mi gran mundo y mi vida

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

ÍNDICE

PRÓLOGO 13

CAPÍTULO 1. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ACEITE ESENCIAL DE AJO, UNA NUEVA ALTERNATIVA AL TEBUCONAZOL COMO AGENTE DE RECUBRIMIENTO DE SEMILLAS 17

1. Introducción 19
2. Materiales y métodos 22
   - *2.2 Preparación de nanopartículas de quitosano cargadas y sin cargar* 22
   - *2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación y de la eficiencia de carga de las nanopartículas de aceite esencial de ajo-Quitosano (GEO-NPCH)* 23
   - *2.4 Caracterización instrumental de las nanopartículas* 24
   - *2.5 Determinación de la actividad antifúngica* 25
   - *2.6 Evaluación de las nanopartículas de GEO-Quitosano como agente de recubrimiento de semillas* 26
   - *2.7 Estadísticas* 27

3 Resultados y discusión 27
   - *3.1 Tamaño y carga superficial de las nanopartículas de GEO-Quitosano* 27
   - *3.2 Eficiencia de encapsulación y eficiencia de carga* 29
   - *3.3 Estructura química de las nanopartículas de GEO-Chitosan* 30

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

3.4 Propiedades térmicas de las nanopartículas GEO-Chitosan..... 32
3.5 Cristalinidad de las nanopartículas de GEO-Quitosano..... 33
3.6 Caracterización morfológica de las nanopartículas de GEO-Chitosan 34
3.7 Propiedades antifúngicas de GEO-NPCH..... 35
3.8 Efectos de la GEO-NPCH en semillas recubiertas 38
4. Conclusión..... 42

CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOGÉNICA RECUBIERTAS DE QUITOSANO A PARTIR DE RESIDUOS DE TRIGO ALBACETENSE COMO ANTIFÚNGICO VERDE Y NANOPRIMIG EN SEMILLAS DE TRIGO 43

1. Introducción..... 45
2. Materiales y métodos 48
2.1 Material 48
2.2 Preparación del extracto vegetal 48
2.3 Contenido de flavonoides y polifenoles en el extracto de hoja de trigo..... 48
2.4 Síntesis de nanopartículas biogénicas de plata recubiertas de quitosano (AgNP-CH) 49
2.5 Caracterización de las nanopartículas..... 50
2.6 Determinación de la actividad antifúngica de las nanopartículas sintetizadas..... 51
2.7 Eliminación de radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) ... 52
2.8 Evaluación del AgNP-CH biogénico como agente de recubrimiento de semillas..... 52
3. Resultados y discusión..... 53
3.1 Polifenoles y flavonoides en el extracto de hoja de trigo..... 53
3.2 Síntesis y caracterización de las AgNP-CH biogénicas..... 54
3.3 Análisis FT-IR de AgNP-CH biogénicas..... 55
3.4 Tamaño y carga superficial de las nanopartículas..... 56

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

3.5 Morfología y análisis elemental de las nanopartículas biogénicas de AgNP-CH 57
3.6 Actividad antifúngica de las nanopartículas de plata biogénicas..... 58
3.7 Propiedades antioxidantes de las nanopartículas de plata biogénica 60
3.8 Nanopartículas de plata recubiertas de quitosano como agente seguro de recubrimiento de semillas..... 61
3.9 Determinación del contenido de clorofila de las plantas tratadas.... 63
4. Conclusiones 63

CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COMO AGENTE DE RECUBRIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE AJO ENCAPSULADO EN NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO EN UN CICLO COMPLETO EN CULTIVOS DE TRIGO, AVENA Y CEBADA..... 65

1. Introducción..... 67
2. Materiales y métodos 68
2.2 Preparación de nanopartículas de ajo-quitosano..... 68
2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación y de la eficiencia de carga de las nanopartículas de aceite esencial de ajo-Quitosano (GEO-NPCH) 69
2.4 Evaluación de las nanopartículas de GEO-Quitosano como agente de recubrimiento de semillas..... 70
2.5 Contenido de flavonoides, polifenoles y clorofilas en las plantas tratadas 70
2.7 Estadísticas 71
3 Resultados y discusión..... 72
3.1 Evaluación del tratamiento de semillas con GEO-NPCH en trigo de secano 72
*3.2 Evaluación del tratamiento de semillas con GEO-NPCH en cebada*76
3.3 Evaluación del tratamiento de semillas con GEO-NPCH en avena. 80
4. Conclusiones finales..... 84

BIBLIOGRAFÍA 87

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

PRÓLOGO

El continuo y veloz aumento de la población mundial es la principal causa del incremento de la demanda en términos de producción agrícola; en efecto, se prevé que la producción crezca un 1,4% de manera anual desde 2021 a 2030 (Tsalidis, 2022). El problema no sólo radica en la subida de la demanda, sino también en: el encarecimiento de los precios en los últimos años a nivel nacional, europeo y mundial (Figuras 1 y 2); en las pérdidas ingentes por plagas y en las resistencias a numerosos plaguicidas utilizados desde hace décadas (alrededor de un 30% de pérdidas cada año) (Hassan et al., 2021)

La distribución de la superficie de cultivos de cereal es muy extensa en España. Las principales regiones que se encargan de su producción son Castilla y León, Castilla-La Mancha, Aragón y Andalucía. De entre estos cereales, el trigo es junto al maíz, el cereal de mayor importancia en cuanto a producción mundial. El balance estimado en superficie de cultivo muestra que un tercio del total es destinada a la producción del trigo actualmente en España (campaña 2021/2022)(Agrarios et al., 2019) (Figura 3).

Sin embargo, la creciente población mundial y el exceso del uso de los tratamientos convencionales que se han ido aplicando durante las últimas décadas han dado lugar a la aparición de mecanismos de resistencia producidos en microorganismos patógenos en cultivos, la contaminación del ecosistema y el impacto medioambiental. Además, recientemente se descubrió que el tratamiento de recubrimiento de semillas habitual, basado en la aplicación del antifúngico tebuconazol, ha sido el causante

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

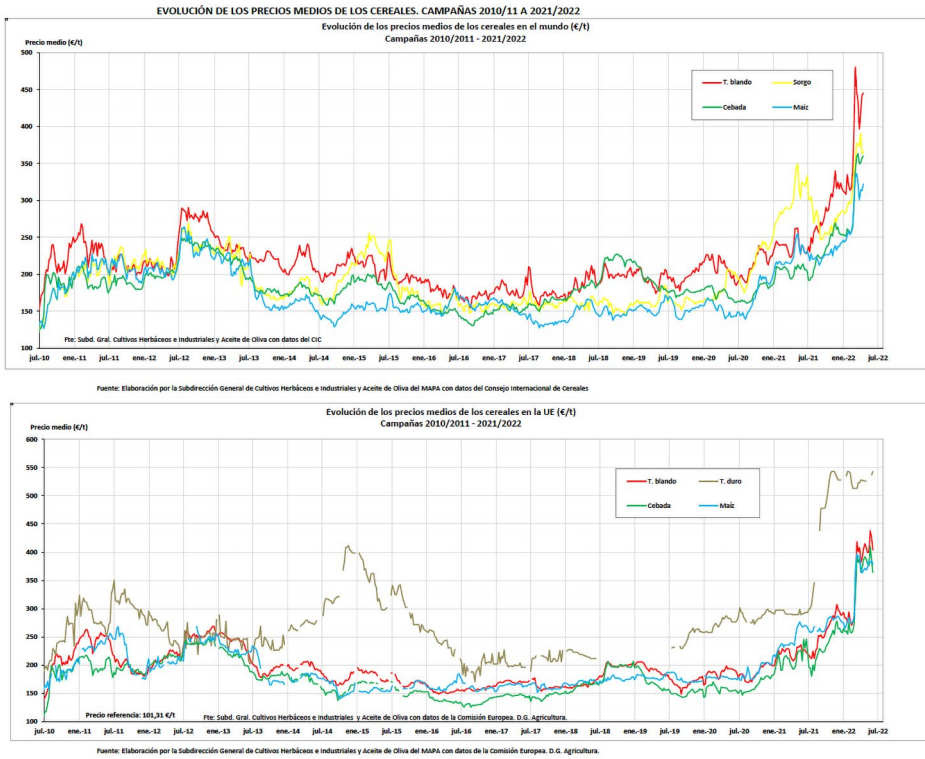
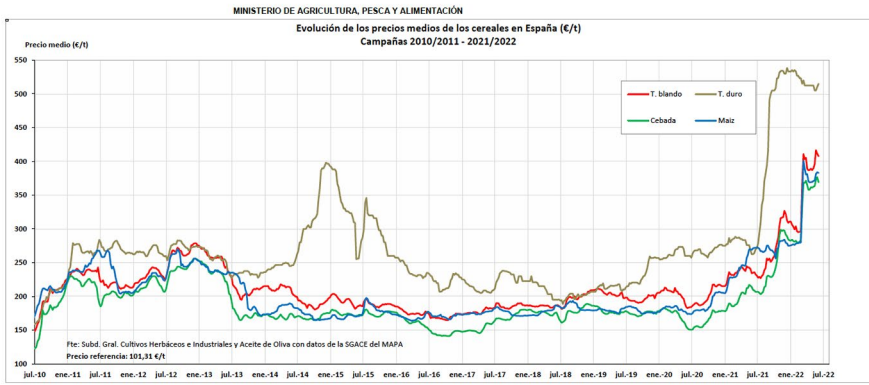


Figura 1: gráficos de la evolución de precios en trigo blando, sorgo, cebada y maíz a nivel mundial y europeo.

de la disminución tan abrupta de la población de la Perdiz roja, una de las especies de aves granívoras de más interés en la provincia. De hecho, la población de perdiz ha disminuido en un 51% entre los años 2010-2017 en Castilla-La Mancha, lo que ha generado bastante inquietud, al tratarse de una especie de gran importancia cinegética en España. (Fernández-Vizcaíno et al., 2022)

Todo ello ha llevado a los organismos regulatorios europeos en materia alimentaria a revisar la reglamentación de los tratamientos fito-sanitarios realizados en toda la comunidad europea, de manera de que el fin de los tratamientos convencionales es inminente e irrevocable por necesidad, animal, ambiental y humana. La Unión Europea pretende la reducción del uso de plaguicidas con su política de potenciación de la agricultura ecológica con estrategias como «De la Granja a la Mesa», de

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»



Campaña 2021/22	MUNDIALES				UNION EUROPEA				ESPAÑA			
	Trigo blando	Cebada	Maíz	Sorgo	Trigo blando	Trigo duro	Cebada	Maíz	Trigo blando	Trigo duro	Cebada	Maíz
Media (€/t)	267,51	220,86	220,47	274,05	252,92	382,11	232,85	259,02	251,38	364,57	220,58	247,44
Máximo (€/t)	480,74	363,42	336,36	391,05	438,00	543,00	410,00	396,67	411,05	538,33	371,43	401,00
Mínimo (€/t)	188,68	160,79	139,17	175,24	169,02	272,23	146,61	172,67	186,33	257,50	150,93	175,20

Figura 2: gráfico de la evolución de precios a nivel nacional.

tal manera que para el año 2030, el 25% de la tierra agrícola sea cultivada de forma ecológica. Objetivo que probablemente sería más fácil alcanzar sin la prohibición del uso de organismos genéticamente modificados en cultivo orgánico (Tsalidis, 2022).

Debido a ello, la búsqueda de nuevas alternativas respetuosas y ecológicas con el medio ambiente es una urgente necesidad para el desarrollo de una agricultura y una alimentación humana y animal sostenible. Dentro de las alternativas más estudiadas a nivel mundial es el uso de diversos extractos vegetales y/o aceites esenciales, algunos de los cuales se les atribuye grandes efectos antimicrobianos. Unos de los aceites esenciales más prometedores es el aceite esencial de ajo el cual aúna efectos antibacterianos y antifúngicos. Además, el ajo es un cultivo de importancia fundamental en Castilla-La Mancha y sobre todo en Albacete, cabe mencionar que la comunidad autónoma dedica un 70% de su superficie al ajo y que Albacete sigue siendo líder nacional y regional en la producción, con 126.000 toneladas y el 45% de su superficie reservada a este cultivo. Sin embargo, los costes de producción han aumentado un 30%, mayoritariamente por el precio de los fitosanitarios (Tsalidis, 2022). En este punto, cabe hacer hincapié en la importancia que tiene el uso de los subproductos obtenidos de la recolección del ajo, que pueden ser empleados

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

en la elaboración de otros compuestos de interés, como el aceite de ajo, producido de la destilación de los ajos troceados de pequeño calibre.

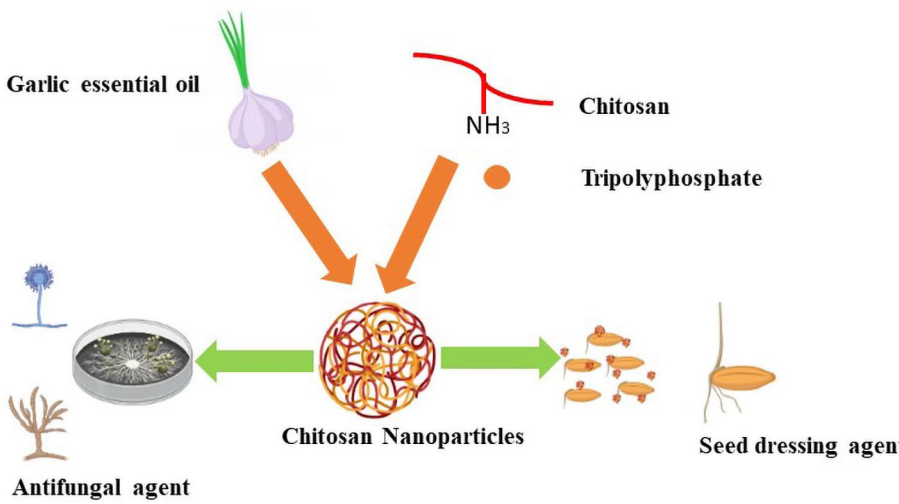
Por otro lado, una de las herramientas más novedosas y útiles que han revolucionado el presente y constituirán el vehículo hacia el futuro de la medicina y la agricultura más eficiente es la Nanotecnología. Un claro ejemplo ha sido la aplicación de esta herramienta para la realización de las vacunas más eficientes contra la COVID-19 donde los resultados han sido más que satisfactorios. Por otro lado, en el sector agrícola ya se han propuesto como «cabeza de cartel» para ser la solución del futuro a los tratamientos actuales permitiendo obtenerse, a través de esta técnica, una amplia gama de productos con materiales ecológicos y de reaprovechamiento de residuos que permitirán obtener tratamientos más eficientes y respetuosos con el medio ambiente.

Con todo ello, en el presente trabajo de investigación básica desde una propuesta y necesidad económica, se han obtenido una serie de candidatos de tratamientos fitosanitarios ecológicos libres de síntesis química basados en un enfoque de economía circular a través del reaprovechamiento de residuos del ajo y los residuos de hojas de trigo de la provincia de Albacete como materia prima para la realización de procesos nanotecnológicos de última generación con el fin de obtener unos nuevos tratamientos ecológicos, biodegradables y alternativos a los tratamientos convencionales para el recubrimiento de semillas y fungicidas que podrán solucionar el inminente problema económico sobrevenido por las nuevas legislaciones. En una primera parte del trabajo se detallará toda la experimentación y desarrollo de un tratamiento de semillas de cereales a través de nanopartículas basadas en la encapsulación de aceite esencial de ajo recuperado de los destríos de los cultivos; en la segunda parte se reaprovecharán los residuos de los cultivos de trigo albaceteño para la generación de nanopartículas de plata biogénicas con el fin de obtener un tratamiento fungicida en semillas; y por último, se detallarán los experimentos llevados a cabo para evaluar los efectos en un ciclo de crecimiento completo en semillas de cereales tratadas con nanopartículas obtenidas con el aceite esencial de ajo para ver la viabilidad de la utilidad de estos nuevos tratamientos que sin duda podrán ser una solución al presente problema, pudiendo ser un nuevo motor económico de la provincia.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

CAPÍTULO 1

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ACEITE ESENCIAL DE AJO, UNA NUEVA ALTERNATIVA AL TEBUCONAZOL COMO AGENTE DE RECUBRIMIENTO DE SEMILLAS



Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

1. Introducción

Las enfermedades causadas por hongos patógenos del suelo son la causa principal de graves pérdidas en la producción agraria y una amenaza para la seguridad alimentaria humana y animal (Fisher et al., 2012). Los agentes antifúngicos han contribuido en gran medida a la protección de los cultivos agrícolas, lo que ha permitido aumentar la productividad agrícola. Sin embargo, el crecimiento de la población mundial, el calentamiento global y el aumento de la resistencia fúngica suponen nuevos retos para el sector agrícola, lo que lleva a la necesidad de contar con fungicidas eficientes y ecológicos.

En la actualidad, los triazoles son los antifúngicos más utilizados debido a su alta eficacia y su actividad de amplio espectro. Dentro de esta familia, el tebuconazol (TB) es un fungicida sistémico eficaz que ha sido ampliamente utilizado tanto en el sector agrícola como en el médico para el control de enfermedades fúngicas, y es el principal antifúngico utilizado actualmente como agente de recubrimiento en semillas de diferentes cereales (Marín et al., 2013). Sin embargo, la práctica extensiva de TB y otros triazoles en la agricultura ha suscitado preocupación por sus repercusiones medioambientales, así como por los riesgos derivados debido a sus efectos toxicológicos y a la aparición de cepas de hongos patógenos resistentes a los antifúngicos (Brauer et al., 2019) Un claro ejemplo es el realizado por López-Antia y colaboradores donde han observado como la disminución drástica de la población de Perdiz roja, especie de alto interés tanto agrícola com cinegética en nuestra provincia, se ha visto reducida por el consumo de semillas tratadas con este antifúngico durante décadas (López-Antia et al., 2021). Por ello, es importante desarrollar estrategias

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

alternativas al tratamiento con antifúngicos habituales, combinando compuestos ecológicos con actividad antifúngica, así como elicitores que potencien las defensas de la planta frente al ataque fúngico.

Los aceites esenciales (AEs) y los terpenos derivados de los mismos son grandes candidatos como agentes naturales antifúngicos, antimicrobianos y antioxidantes (D'Agostino et al., 2019), (Valdivieso-Ugarte et al., 2019), (Mahizan et al., 2019). Algunos AEs y terpenos pueden actuar como antifúngicos a través de diferentes mecanismos, como desestabilizadores de la membrana/pared, por inhibición de la bomba de eflujo, actuando contra la mitocondria fúngica o produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), etc. (Nazzaro, 2017). Los AEs y terpenos pueden extraerse de diferentes plantas y drogas con compuestos volátiles. Una de las especies más importantes, desde el punto de vista económico y agrícola de la provincia de Albacete es el ajo o *Allium sativum L*. Sin embargo, debido a las exigencias del mercado genera unas grandes toneladas de destríos por falta de calibre o diversas propiedades organolépticas indeseadas, los cuales pueden reutilizarse mediante procesos de economía circular para la generación o extracción de su aceite esencial ya que contiene grandes cantidades de estos compuestos. El AE del ajo está compuesto principalmente por disulfuro de alilo, trisulfuro de alilo, disulfuro de alilo (E)-1-propenilo, trisulfuro de alilo y tetrasulfuro de dialilo (Thuy et al., 2020). Estos compuestos sulfurados interactúan con los grupos de sulfuro de hidrógeno de la célula y pueden formar enlaces disulfuro mostrando actividad antifúngica contra diferentes especies de hongos como *Aspergillus niger, Penicillium cyclopium* y *Fusarium oxysporum* entre otros (Benkeblia, 2004) (Somrani et al., 2020).

A pesar de sus prometedoras propiedades, las aplicaciones de los AEs y los terpenos siguen viéndose obstaculizadas por su alta volatilidad, su baja solubilidad en agua y su inestabilidad frente a la luz y el oxígeno (Niza et al., 2020). La encapsulación de estos compuestos bioactivos es un enfoque eficaz para protegerlos contra la degradación en condiciones ambientales adversas.

El quitosano (CH) es un copolímero lineal de origen natural extraído de diversas fuentes como las cáscaras de los crustáceos y determinados

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

hongos. Está compuesto por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina enlazadas (1-4) y actualmente está llamando la atención como materia prima prometedora en aplicaciones farmacéuticas, medicinales y de control de cultivos (Hosseinnejad & Mahdi, 2016). Se utiliza habitualmente en el control de cultivos en la agricultura ecológica contra la prevención y el control enfermedades de las plantas, y se ha demostrado que presenta actividad contra un amplio espectro de hongos, inhibiendo tanto su crecimiento como su desarrollo (Muzzarelli et al., 2001). Además, este polisacárido catiónico tiene enormes y prometedoras aplicaciones en el campo de la nanotecnología debido a su fácil control y extracción, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, propiedades antifúngicas, fácil modificación química además de, su capacidad para formar geles, películas y nanopartículas sólidas (Keawchaoon & Yoksan, 2011), (Hu & Luo, 2016), (Ashra et al., 2019). La versatilidad de este polímero y las propiedades antifúngicas del quitosano ha permitido que se haya utilizado para mejorar la estabilidad y potenciar las propiedades fungicidas de algunos AEs como el aceite esencial de clavo, inhibiendo el crecimiento de *Cymbopogon martini* (Roxb.) W.Watson y *Foeniculum vulgare* Hill entre otros (Hasheminejad et al., 2019), (Kalagatur et al., 2018). Además, los oligosacáridos derivados del CH se han descrito como un elicitor que conduce a una variedad de respuestas de defensa en las plantas hospedadoras contra las infecciones microbianas, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, proteínas relacionadas con el patógeno (PR) e inhibidores de la proteinasa, la síntesis de lignina y la formación de calosa (Hadrami et al., 2010). Además, el CH se ha aplicado como agente de tratamiento foliar (Bittelli et al., 2001), como tratamiento del suelo (Rabea et al., 2003) y como agente de recubrimiento de semillas (Kananont et al., 2010).

Se han aplicado diferentes técnicas de encapsulación para proteger los AEs y los terpenos. Entre estas técnicas, se ha utilizado el método de gelificación iónica a través de un material no tóxico y multivalente como el Tripolifosfato, (TPP) (Hadidi et al., 2020) para encapsular el AE de orégano, el eugenol, el carvacrol, el AE de *Mentha spicata* Crantz, 1769, el AE de clavo y el AE de *Satureja hortensis* L., entre otros (Hosseini et al., 2013) (Woranuch & Yoksan, 2013), (Keawchaoon & Yoksan, 2011),

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

(Ashra et al., 2019), (Hasheminejad et al., 2019), (Hadidi et al., 2020), (Feyzioglu & Tornuk, 2016). Además, las formulaciones nanopartículas de CH (NPCH) mostraron actividades prometedoras al promover la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas en el tomate y otras especies de plantas (Chun & Chandrasekaran, 2019).

Por lo tanto, el presente estudio se ha diseñado con un triple propósito: evaluar la encapsulación del aceite esencial obtenido de los destríos de ajo generados en la provincia de Albacete (GEO) en nanopartículas ecológicas de TPP-NPCH para mejorar su estabilidad; aumentar su actividad antifúngica contra varios hongos, y evaluar su eficiencia como agente de recubrimiento antifúngico en diferentes semillas de cereales de Albacete, como una alternativa ecológica a la TB. También buscamos los posibles efectos del elicitor sobre la germinación de las semillas en condiciones controladas y de campo.

2. Materiales y métodos

El quitosano de bajo peso molecular (CH) (50-190 kDa) con un grado de desacetilación del 75-85 %, el tripolifosfato (TPP), el bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT), el tebuconazol (TB) y todos los disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El Orius 20 EW (20% de Tebuconazol) de Nufarm España y el GEO fue extraído de diversos destríos de la provincia de Albacete. Los organismos utilizados para los ensayos antifúngicos consistieron en especies de *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab., *A. niger* Tiegh. y *Fusarium oxysporum* Schltdl., que se aislaron del suelo y se examinaron visual y microscópicamente para la caracterización morfológica de los aislados, como se describió previamente en (Palmero et al., 2014) y se confirmó su identidad utilizando cebadores ITS como se describe en (Gardes et al., 1993).

2.2 Preparación de nanopartículas de quitosano cargadas y sin cargar

Las nanopartículas de quitosano (NPCH) se formularon mediante el método de gelificación iónica descrito por (Keawchaoon & Yoksan, 2011) con algunas modificaciones. Brevemente, se preparó una solución de CH al 0,2% disolviendo copos de CH en ácido acético al 1% bajo

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

agitación continua durante la noche. Luego, la solución de CH se sonicó durante 10 minutos hasta que se disolvió completamente. Se mezclaron 50 mL de solución de CH en una disolución de Tween 80 al 1% a 1000 RPM a una temperatura de 50ºC. Finalmente, se añadió gota a gota una disolución acuosa de TPP al 0,2% a un caudal de 2 mL/min bajo agitación continua para inducir la gelificación iónica. Después, se mantuvieron en agitación a 700 RPM durante 40 minutos. Las nanopartículas se recogieron después de centrifugarlas a 15.000 RPM durante 20 min a 4ºC y, posteriormente, se lavaron varias veces con agua mQ. La suspensión de nanopartículas se congeló a -80ºC y se liofilizó durante 48h a -50ºC (LyoQuest-85 / 208V 60 Hz, Teslar).

La encapsulación de la GEO en nanopartículas de quitosano (GEO-NPCH) se formuló en un proceso de dos pasos: en primer lugar, se llevó a cabo una emulsión oleo-acuosa (o/w), seguida del método de gelificación iónica descrito anteriormente. Brevemente, se mezclaron 50 mL de solución de CH, previamente preparada en una disolución de Tween 80 al 1%, y se agitó a 1000 RPM a una temperatura de 50ºC. Posteriormente, se añadieron gota a gota diferentes cantidades de GEO para formar cuatro propuestas de CH:GEO a diferentes ratios de proporción (1:0, 1:0,25, 1:0,5,1:0,75 y 1:1 p/p) bajo agitación continua y se emulsionó a 1000 RPM durante 10 min a temperatura ambiente. Por último, se añadió gota a gota una disolución acuosa de TPP al 0,2% a un caudal de 2 mL/min bajo agitación continua para inducir la gelificación iónica. Después, se agitó a 700 RPM durante 40 min. Las nanopartículas se recogieron después de centrifugarlas a 15.000 RPM durante 20 min a 4ºC y, posteriormente, se lavaron varias veces con agua mQ. La suspensión de nanopartículas se congeló a -80ºC y se liofilizó durante 48h a -50ºC (LyoQuest-85 / 208V 60 Hz, Teslar).

2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación y de la eficiencia de carga de las nanopartículas de aceite esencial de ajo-Quitosano (GEO-NPCH)

Se mezcló una suspensión de la muestra (100 µL) con 5 mL de HCL 2M y se hirvió a 95 ºC en reflujo. Después de enfriar, se añadió 1 mL de Etanol absoluto a la mezcla homogénea antes de centrifugar a 9.000 rpm

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

durante 1 min a 25ºC. El sobrenadante se analizó por espectrofotometría UV-vis en un rango de longitudes de onda de 250-400 nm para cubrir la longitud de onda máxima de absorción del aceite esencial de ajo (325nm) (Ang et al., 2009). También se prepararon nanopartículas de quitosano sin GEO (NPCH) como control sin sustancia activa de la misma manera.

La capacidad de carga (LC) y la eficiencia de encapsulación (EE) del GEO se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:
LC % = (peso de la GEO encapsulada (mg)) / (peso del total (GEO encapsulada + peso del material) (mg)) × 100%
EE % = (peso de GEO encapsulado (mg)) / (peso inicial de GEO (mg)) × 100%

2.4 Caracterización instrumental de las nanopartículas

La caracterización de las partículas de las nano-formulaciones (tamaño, potencial zeta e índice de polidispersidad (PDI)) se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un Zetasizer (3000HSM Malvern Ltd, IESMAT, España) con las siguientes especificaciones: índice de refracción (IR) del quitosano de 1,700, índice de absorción 0,010 y RI del disolvente agua: 1,33, con una viscosidad de 0,8872 cP. Las mediciones se realizaron por triplicado.

El espectro IR se registró en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) (VARIAN 640-IR con una placa de cristal de rendimiento Pike Diamond/ KRS-5 HS) y los principales picos se indicaron en cm^{-1}. El ATR nos permite utilizar las muestras directamente en estado sólido o líquido sin necesidad de una matriz de KBr o de yodo de lugol. En concreto, para NPCH y GEO-NPCH, se pulverizaron 20 mg de nanopartículas en un mortero, se colocó el sólido fino en la placa de diamante y se presionó hasta obtener un pellet homogéneo. La GEO, al ser líquida, se colocó una gota de aproximadamente 20µL sobre la placa y se colocó la punta de manera que la tensión superficial de la gota cubriera la placa de diamante de manera homogénea. Se adquirieron 256 escaneos con una resolución del instrumento de 1 cm^{-1} en el rango espectral entre 650 y 4000 cm^{-1}

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

debido al corte de frecuencia del elemento de reflexión interna (IRE) del ATR-FTIR utilizado.

Los mecanismos de descomposición térmica se determinaron en un analizador termogravimétrico (TGA Q20, TA Instruments) equipado con un plato de platino estándar. Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se llevaron a cabo utilizando un sistema DSC Q50 (TA Instruments) equipado con un plato de aluminio estándar con una velocidad de calentamiento creciente de 10ºC/min (30-320ºC) para investigar la estabilidad térmica de GEO, NPCH y GEO-NPCH puros. Se utilizó una muestra de indio como referencia. En todos los casos, se calentaron muestras de unos 3 mg a una velocidad de 10ºC min^{-1} bajo atmósfera de nitrógeno.

Los patrones de difracción de rayos X (XDR) de las muestras se escanearon en un rango 2θ de 5 a 60º utilizando un difractómetro X-R con un ángulo de velocidad de 0,05º /min.

El análisis morfológico de la superficie y la forma del NPCH y del GEO-NPCH se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron pulverizadas con Pt y observadas con un microscopio electrónico Jeol 7800 F a 20 KV.

2.5 Determinación de la actividad antifúngica

Se evaluaron diferentes proporciones de CH:GEO (1:0, 1:0,25, 1:0,5 y 1:0,75) mediante parametrización morfológica y dimensionada. Para el análisis antifúngico se eligió la relación GEO-NPCH 1:0,75 para realizar el ensayo, ya que esta combinación dio lugar a una PDI < 0,7 y a una LC más alta que las relaciones 1:0,5 y 1:0,25.

El ensayo antifúngico con esporas de *A. versicolor, A. niger* y *F. oxysporum* se realizó según (Rubio-moraga et al., 2013), con algunas modificaciones. Los tratamientos se prepararon en un tubo Eppendorf estéril que contenía 3.000 esporas (40 µL) de cada hongo en caldo de dextrosa de patata (PDB) estéril, y 20 µL de los diferentes tratamientos. La mezcla se vertió en un agujero perforado con una pipeta Pasteur en el centro de las placas de agar papa dextrosa (PDA). Todas las placas se incubaron a 28ºC durante 6 días para evaluar el índice antifúngico (%)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

=((C-T)/C) x 100, y las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) de cada tratamiento, donde C y T eran el crecimiento radial (mm) para el control y para las placas tratadas con los diferentes hongos.

El ensayo antifúngico tras la germinación de las esporas se realizó según (Rubio-Moraga et al., 2013), con algunas modificaciones. La suspensión de esporas a una concentración de 5 x 10^3 esporas/mL (100 µL) se transfirió a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las placas se incubaron 24 horas a 28 ºC y se añadieron los tratamientos mediante el método de dilución en serie con un factor de dilución de 1/3. Las placas se incubaron durante otras 24 horas a temperatura ambiente y todas se trataron con 10 µL de bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT; 5 mg/mL en PBS; Sigma, Spain). Por último, las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente, seguida de la adición de 100 µL de disolvente de MTT (0,1 NHCl en alcohol isopropílico anhidro).

2.6 Evaluación de las nanopartículas de GEO-Quitosano como agente de recubrimiento de semillas

Para evaluar la tasa de germinación de los diferentes agentes de recubrimiento de semillas, se recubrieron tres lotes de 30 g de semillas de trigo (*Triticum vulgare* L.), avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare* Vill.) con 3,5 mL de cada tratamiento. Se utilizaron 30 g de semillas sin tratamiento, 30 g de semillas tratadas con NPCH y GEO-NPCH a 2,5 mg/mL y 30 g de semillas tratadas con TB a dosis comerciales (9 mg/mL de TB pura). Tras el recubrimiento, las semillas se secaron a temperatura ambiente. Se colocaron lotes de 100 semillas de cada cereal en papel de filtro húmedo estéril y se incubaron a 25 ºC durante 5-7 días en una cámara de germinación con 21,8 ºC y un ciclo de iluminación con 8 h de luz y 16 h de oscuridad. El efecto sobre la germinación de las semillas se evaluó contando el número de semillas que sobrevivían. El experimento se realizó por triplicado.

Para evaluar los efectos morfológicos en las plantas, se trataron lotes de 100 g de semillas de trigo con NPCH y GEO-NPCH a diferentes concentraciones (7 mg/mL, 2 mg/mL y 1 mg/mL). El efecto se comparó

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

con la concentración recomendada por el fabricante de la formulación de TB (45 mg/mL de producto con 9 mg/mL de TB pura). Cada tratamiento se probó en condiciones de cultivo. Las semillas se cultivaron en Albacete (España) en las coordenadas 39°07'06.2 "N 1°30'40.8 "W. Se dividieron 10 m^2 del área de cultivo en 6 microparcelas para cada tratamiento. Se recogió un lote de 10 semillas para cada tratamiento 15 días después de la siembra. Las semillas se evaluaron midiendo el peso, la longitud de las raíces y la longitud de las hojas en cm. Se analizaron de tres a cinco réplicas biológicas con tres réplicas técnicas por cada réplica biológica.

2.7 Estadísticas

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet con el software estadístico GraphPad Prism versión 5.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. Las diferencias se comprobaron a $< 0,05$ (nivel de probabilidad del 95%).

3 Resultados y discusión

3.1 Tamaño y carga superficial de las nanopartículas de GEO-Quitosano

La estructura molecular del quitosano puede modificarse para alterar propiedades como la solubilidad, la mucoadhesión y su estabilidad para buscar diversas aplicaciones específicas. Los grupos -NH2 y -OH del quitosano son los sitios activos más habituales para diversas modificaciones. Debido a su perfil de seguridad, biodegradabilidad y biocompatibilidad, el quitosano se está utilizando en diferentes campos, como el biomédico, el farmacéutico, el alimentario y el medioambiental. Para mejorar la estabilidad y la eficacia de la encapsulación de GEO, se obtuvieron nanopartículas de GEO-quitosano utilizando diferentes formulaciones de proporción CH:GEO que iban de 1:0 a 1:1. Para determinar el tamaño de las NP, el potencial Z y el índice de polidispersidad (PDI) de las distintas relaciones, se aplicó la técnica DLS. Los resultados presentados en la tabla 1 mostraron que las NPs oscilan entre 172 y 352 nm de diámetro; mientras que el tamaño de estas NPs aumentó a medida

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

que se incrementó la cantidad de GEO inicial. Este comportamiento ha sido reflejado previamente en otros trabajos con aceites esenciales como el de clavo. En este trabajo los autores describieron que el aumento de la incorporación de aceite de clavo en la formulación incrementaba el tamaño de las NP desde 265 nm (proporción 1:0,25) hasta 445 nm (proporción 1:1) (Hadidi et al., 2020). El aceite esencial de *Mentha ×piperita* L. encapsulado en un nanogel de quitosano mostró un aumento de tamaño de 567 nm a 576 nm tras la incorporación del aceite esencial (Ashra et al., 2019). Tavassoli y colaboradores formularon nanopartículas a partir de nanofibras de quitosano mediante reticulación con TPP encapsulando Quercetina y Lactoferrina, alcanzando un rango de tamaño entre 87,5 y 200,3 nm (Sani et al., 2021). El PDI mostró el mismo patrón en comparación con el patrón de tamaño de las NPs, el índice PDI de las NPs fue mayor a medida que se incrementaba la cantidad de GEO y pasó de 0,4 en 1:0,25 a 0,7 en 1:1, confirmando que las formulaciones son monodispersas y estables. Mientras tanto, la formulación de proporción CH:GEO 1:1 mostró un valor de PDI > 0,7, lo que indica una distribución de tamaño de partícula muy amplia (Danaei et al., 2018).

Todas las formulaciones ensayadas presentaron una carga superficial positiva con un intervalo que osciló entre +19,8 y +49,8 mV, lo que concuerda con estudios anteriores relativos a NPs de quitosano que encapsulan diferentes moléculas activas. Estas cargas positivas surgen de la protonación de los grupos amino. Otras formulaciones que encapsulan GEO, como los liposomas descritos por Kamkar y colaboradores mostraron cargas negativas (-7,23 mV) debido al uso de lípidos no catiónicos en su formulación (Kamkar et al., 2021). Una formulación diferente de encapsulación Simvastatina en nanopartículas de quitosano mostró la misma tendencia y también se observó una carga superficial positiva que iba de +16 a + 45 mV (Delan et al., 2020). Asimismo, un estudio realizado por Woranuch y colaboradores describió que la carga superficial de las nanopartículas de quitosano tras la encapsulación de eugenol tiene una carga positiva que va de +16 a +34 mV (Woranuch & Yoksan, 2013). Los estudios con timol encapsulado en nanopartículas de quitosano mostraron una carga superficial positiva en todas las diferentes proporciones

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

de quitosano, surfactante, terpeno tras someterla a varios cambios de temperatura (Çakır et al., 2020). La carga superficial positiva disminuye con el aumento del tamaño de la GEO en las NPs debido a la interacción de la GEO con las NPs, produciendo cambios en la estructura y la carga. Además, los resultados del potencial Z confirman que las NPCH y GEO-NPCH 1:0,25, 1:0,5 y 1:0,75 tienen una alta estabilidad, como se muestra en la tabla 1, mientras que la relación 1:1 CH:GEO presenta una formulación más inestable +19,8 mV, que coincide con el valor del PDI. Algunos grupos de investigación han comprobado la misma dinámica con un incremento del tamaño de las nanopartículas de CH asociado a un descenso del potencial zeta, que bajaba cuando se aumentaba la cantidad de fármaco utilizado (Keawchaoon & Yoksan, 2011).

3.2 Eficiencia de encapsulación y eficiencia de carga

Para medir el contenido de GEO en las formulaciones de NPs, se realizó un análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 325 nm. Los resultados, mostrados en la tabla 1, indicaron que el EE% disminuyó y el LC% aumentó con las cantidades de GEO utilizadas en estas formulaciones. Estos resultados parecen estar de acuerdo con estudios anteriores para otros aceites como el orégano, que oscilaron entre el 25% y el 1% y el 6% y el 2% de EE% y LC%, respectivamente (Hosseini et al., 2013)), Otro trabajo con *Coriandrum sativum* L. encapsulado en nanopartículas de quitosano mostró una disminución del 76% al 41% del EE% con el aumento del aceite esencial respecto al quitosano (1:0,6 a 1:1) (Gadkari et al., 2019), mientras que en *Cinnamomun zeylanicum* Breyne la disminución del EE% pasó del 20% al 10% a medida que se aumentaba la cantidad de aceite esencial en la formulación (Matshetshe et al., 2018). GEO-NPCH muestra un alto LC%, con valores que alcanzan hasta el 19,4% como proporción máxima. Estudios anteriores con NPs de aceite de clavo-quitosano han alcanzado un 6,2 LC% en la relación máxima 1:1 CH:EO (Hasheminejad et al., 2019b). Otros estudios con aceite de clavo alcanzaron un EE% del 73,4%, aunque faltan los datos de LC% (Hadidi et al., 2020). Los datos obtenidos en otros trabajos con la encapsulación de eugenol en NPs de quitosano alcanzaron valores de EE% y LC% de

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

20,2% y 12,8% respectivamente (Woranuch & Yoksan, 2013). Los resultados anteriores sugieren que las nanopartículas aumentaron cuando el contenido inicial de las sustancias activas subió, mientras que el aumento de la concentración dio lugar a la reducción de la EE.

Tabla 1. Tamaño medio, polidispersidad (PDI), potencial Z, eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC) para la caracterización de las NPs. Los datos se expresan como media ± p.e.m. de, al menos, tres experimentos independientes

Formulación NP	Tamaño medio (d.nm)	PDI	Potencial Z (mV)	%EE	%LC
NPCH	172.3±0.71	0.42±0.01	+49.8±0.75	-	-
GEO-NPCH 1:0.25	186.9±0.99	0.46±0.02	+32.6±0.60	32.8±3.50	5.2±1.15
GEO-NPCH 1:0.5	194.1±4.37	0.44±0.01	+31.2±0.57	27.8±0.27	8.7±0.27
GEO-NPCH	352.2±1.95	0.51±0.06	+27.3±0.80	24.7±0.58	10.8±0.40
1:0.75					
GEO-NPCH 1:1	253.4±18.58	0.75±0.05	+19.8±0.25	23.8±0.29	19.4±0.98

3.3 Estructura química de las nanopartículas de GEO-Chitosan

La composición química se determinó mediante la identificación de los principales grupos funcionales a través de la técnica FT-IR. El accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) nos permitió identificar los principales grupos funcionales presentes directamente en las nanopartículas o en el aceite esencial sin necesidad de utilizar matrices. El FTIR se emplea normalmente para investigar la interacción entre grupos funcionales. Sin embargo, la técnica nos permite verificar la existencia de grupos funcionales cuyos modos vibracionales son característicos. En nuestro caso, es posible ver bandas de grupos funcionales asociados al GEO en las nanopartículas con la esencia que no están presentes en las nanopartículas sin aceite esencial. En la figura 1 se muestran los espectros FT-IR de GEO, NPCH y GEO-NPCH. Los espectros de NPCH y GEO-NPCH eran muy similares, ya que su contenido era principalmente quitosano. Se observó claramente una banda ancha entre 3750 cm^{-1} y 2500 cm^{-1}, asociada al estiramiento de los enlaces O-H y N-H. Como se muestra en el análisis gravimétrico, las nanopartículas de quitosano eran higroscópicas y tenían una gran tendencia a absorber agua. Esta

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

señal incluye tanto la estructura O-H del quitosano como el agua en sus diferentes intensidades debido a los enlaces de hidrógeno formados. A partir de los espectros, se observaron picos característicos adicionales del quitosano en 2916 cm^{-1} y 2864 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C-H del carbono sp3, 1634 cm^{-1} debido al estiramiento del carbonilo C=O de la amida, 1533 cm^{-1} debido a la flexión N-H del quitosano, y 1066 cm^{-1} debido a la tensión de los diferentes enlaces C-O (Gedam & Dongre, 2015) (Sani et al., 2021). Un examen detallado de la muestra de GEO-NPCH revela pequeños picos asociados a la presencia de GEO. En 3082 cm^{-1}, se observa un pico asociado a la tensión asimétrica del enlace C-H para un carbono sp2, 1422 cm^{-1} debido a la deformación C-H del enlace Csp2-H, y un fuerte pico en 1087 cm^{-1} como consecuencia del estiramiento del grupo S=O.

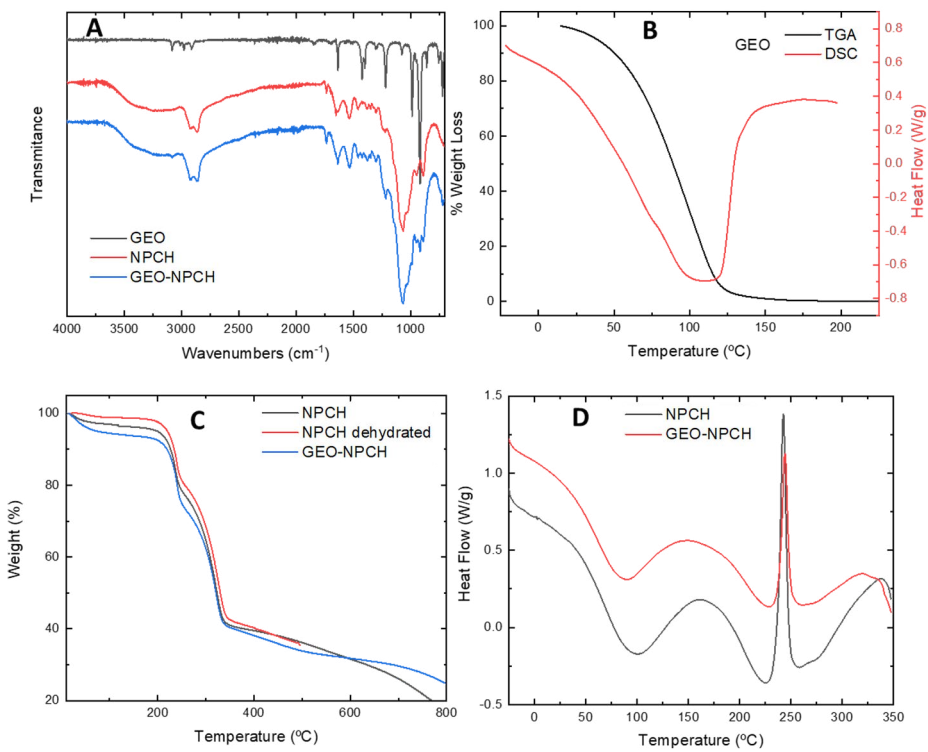


Figura 1 A) FTIR de GEO, NPCH y GEO-NPCH; B) TGA y DSC de GEO; C) TGA de NPCH, NPCH deshidratado y GEO-NPCH; D) DSC de NPCH y GEO-NPCH

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

3.4 Propiedades térmicas de las nanopartículas GEO-Chitosan

Se utilizó el análisis termo-gravimétrico/calorimetría diferencial de barrido (TGA/DSC) para evaluar el material absorbido, la estabilidad térmica y las temperaturas de descomposición del GEO, el NPCH y el GEO-NPCH. El GEO es un compuesto extremadamente volátil que comienza a evaporarse incluso a temperaturas muy bajas, como muestran su TGA y DSC (Figura 1B). Esta pérdida de masa se hace más importante a medida que aumenta la temperatura hasta la completa evaporación del GEO a 125°C. La figura 1C muestra los TGA de NPCH y GEO-NPCH. El NPCH muestra dos pasos de degradación, el inicial que comienza desde el principio del experimento y termina a 100°C, y el segundo que comienza a 170°C hasta 333°C. La primera transición corresponde a una caída de masa del 3,5% y se atribuye a la pérdida de agua adsorbida/ligada/vaporización de la humedad. Para confirmar este hecho, se calentó el NPCH durante 1h a 50°C bajo atmósfera de nitrógeno y posteriormente se enfrió bajo nitrógeno hasta alcanzar la temperatura ambiente. Después de 1h bajo atmósfera de nitrógeno, el termograma no mostró esta primera etapa de pérdida de agua (Figura 1C, línea roja). La segunda etapa de degradación fue una pérdida de peso del 60%, que se debe a la degradación del biopolímero de quitosano puro. Esto se ha observado previamente en otros polímeros de quitosano, donde la cantidad de humedad y el rango de temperaturas de degradación dependen del peso molecular del polímero de quitosano (Szymańska et al., 2020). Estas mismas transiciones se observan en el termograma de GEO-NPCH (Figura 1C, línea azul), coincidiendo en los rangos de temperatura. En la segunda transición, la pérdida de masa fue del 58%, coincidiendo con el grado de descomposición del NPCH. Por otro lado, en la primera transición, la pérdida de masa es mayor, alcanzando el 7% y, aunque el agua absorbida por ambas partículas puede ser diferente, esto puede indicar que este 7% de pérdida podría corresponder no sólo al agua sino también a la pérdida de GEO. Estos datos fueron confirmados por el DSC de NPCH y GEO-NPCH como se muestra en la Figura 1D. De forma similar al TGA, se observan dos transiciones en ambos compuestos. Una endotérmica entre -25°C y 100°C, y una segunda más compleja entre 170°C y 300°C, que

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

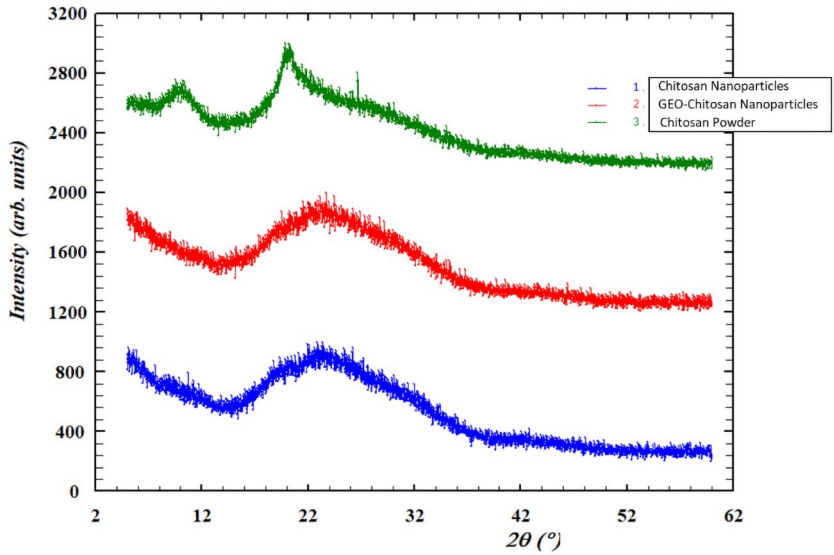


Figura 2 Patrón de difracción de rayos X de nanopartículas de quitosano, GEO-nanopartículas de quitosano y quitosano en polvo (XDR)

combina procesos endotérmicos y exotérmicos, típicos de la descomposición del polímero de quitosano. Para la primera transición, existe una diferencia considerable entre las entalpías de evaporación del NPCH y del GEO-NPCH. Para la NPCH se ha determinado una entalpía de 145 J/g, mientras que la GEO-NPCH muestra un valor más alto, alcanzando los 185 J/g, lo que indica que las nanopartículas cargadas con GEO necesitan más energía para evaporar tanto el agua como la GEO. La GEO encapsulada se descompone a mayor temperatura que la GEO libre, lo que refleja la mejora de la estabilidad térmica de la GEO mediante su encapsulación en nanopartículas de quitosano.

3.5 Cristalinidad de las nanopartículas de GEO-Quitosano

La estructura cristalina del quitosano, NPCH y GEO-NPCH con una proporción CH:GEO de 1:0,75 se determinó mediante XRD y se presenta en la Figura 2. El quitosano presenta un pico acusado a 2θ alrededor de 22º que muestra un alto grado de cristalinidad (Hosseini et al., 2013). Los patrones de XRD de NPCH revelaron un pico amplio causado por la reacción de reticulación entre el quitosano y el TPP, que da lugar a la

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

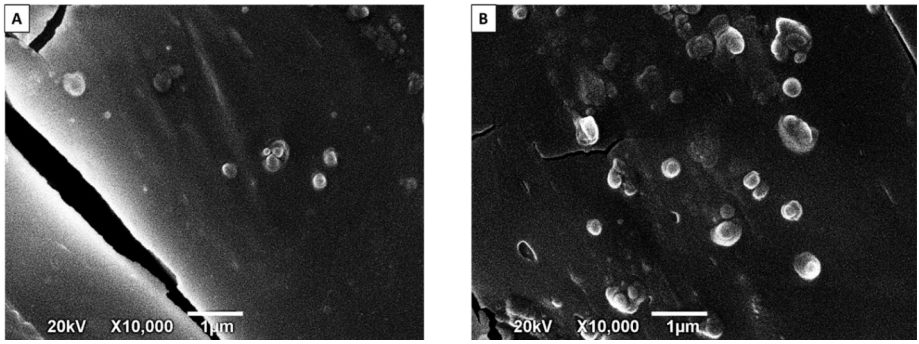


Figure 3 Micrografías de SEM de A) NPCH; B) GEO-NPCH 1:0.75

formación de una estructura amorfa, lo que refleja la destrucción de la estructura de empaquetamiento del quitosano original, como se describe en otros estudios de patrones de XRD de NP de quitosano (Sathiyabama & Parthasarathy, 2016) (Rokhade et al., 2006). Al contrario que en el estudio realizado por Hosseini et al., respecto a la encapsulación de Aceite Esencial de Orégano (OEO), la incorporación de OEO dio lugar a un cambio en la estructura de empaquetamiento del quitosano-TPP. Sin embargo, en nuestro caso, la inclusión de GEO a las NP de quitosano no produjo cambios en su cristalinidad en comparación con las NPCH.

3.6 Caracterización morfológica de las nanopartículas de GEO-Chitosan

Se realizó una micrografía SEM para evaluar las características morfológicas y superficiales de las NPCH y GEO-NPCH. Las imágenes de SEM son un método eficaz para proporcionar conocimiento sobre la morfología de la superficie y una distribución más precisa del tamaño. Las imágenes de SEM de la Figura 3 muestran una nanopartícula esférica en ambos casos, con un diámetro de tamaño inferior a 200 nm en el caso de la NPCH y de 400 nm en la GEO-NPCH en la mayoría de las NP, lo que confirma el aumento de tamaño tras la encapsulación de la GEO. Además, estas imágenes concuerdan con los tamaños obtenidos por la medición DLS y los valores de PDI, donde se observa el hinchamiento y la agregación en las NPs formadas durante la dispersión en suspensión acuosa. Esto también se ha demostrado en trabajos anteriores, como el realizado con eugenol encapsulado en nanopartículas de quitosano, donde se

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

obtuvo un mayor tamaño y valores de PDI en DLS que en las imágenes de TEM debido a la hinchazón y la agregación de las nanopartículas en las dispersiones de agua (Woranuch & Yoksan, 2013). Los mismos efectos se observaron también en formulaciones con carvacrol (Keawchaoon & Yoksan, 2011).

3.7 Propiedades antifúngicas de GEO-NPCH

Se han señalado diversas enfermedades que afectan a los cultivos de cereales con un alto impacto económico, tanto en la provincia de Albacete como en el mundo entero, provocadas por diversos patógenos como *Blumeria graminis* (DC.) Speer*, Puccinia recondita Roberge ex Desm, Puccinia graminis* Pers.*, Puccinia striiformis* Westend.*, Zymoseptoria tritici* (Roberge ex Desm.) Quaedvl. & Crous *y Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous, así como *Fusarium* (Rózewicz et al., 2021).

El tizón provocado por *Fusarium* es la enfermedad más importante que afecta al cultivo del trigo, mientras que otros hongos del género *Fusarium* también pueden causar otras enfermedades: marchitez de las plántulas, podredumbre de la raíz o enfermedad del «take-all». Además de las diferentes enfermedades de los cereales causadas por los hongos mencionados, hay hongos que causan pérdidas de grano durante el almacenamiento y después de la cosecha. Un estudio reciente demostró que los granos de cereal pueden mantenerse infestados en diversos grados durante todo el proceso de almacenamiento. Se aislaron un total de 21 hongos diferentes, Alternaria *alternata* (Fr.) Keissl.*, Penicillium sp, Aspergillus niger, A. flavus, Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn*, Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill.*, Fusarium oxysporum* Schltdl. *y Mucus species*. *Aspergillus* fue el hongo aislado más frecuentemente, seguido de *Aspergillus niger, A. flavus, Aspergillus versicolor, Aspergillus parasiticus* Speare*, Aspergillus ochraceus* G. Wilh. (Varsha bhalerao & Ashok chavan, 2008).

El método más utilizado para proteger los cereales contra los patógenos es la aplicación de fungicidas. Esta práctica ha provocado un aumento de la resistencia a los diferentes fungicidas empleados. El uso de productos químicos para la protección de las plantas también se asocia con la

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

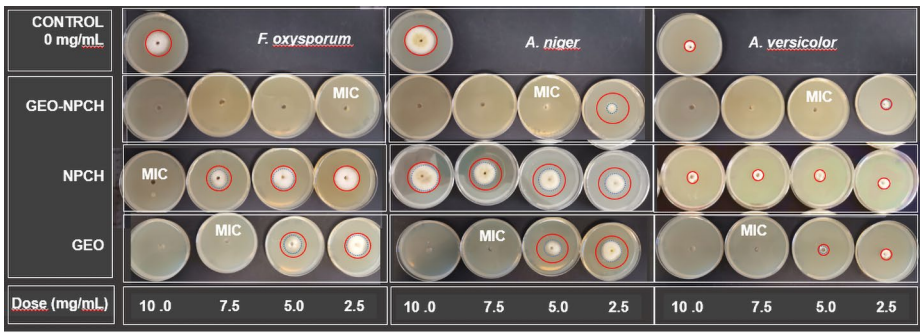


Figura 4 Valores MIC de los tratamientos GEO-NPCH; NPCH y GEO contra las esporas de F. oxysporum, A. niger y A. versicolor antes de la germinación. El crecimiento del micelio en el control y en los tratamientos está marcado con círculos (líneas discontinuas rojas y azules, respectivamente). La figura representa un experimento representativo de tres réplicas.

contaminación del medio ambiente, al suministrar sustancias activas que tienen un efecto nocivo en el aire, el agua, el suelo o los organismos vivos. La búsqueda de métodos alternativos y más ecológicos para el control de hongos patógenos en las enfermedades de los cereales, en la postcosecha y en el almacenamiento, nos llevó a ensayar diferentes concentraciones de nanopartículas contra especies de *Fusarium y Aspergillus.*

La actividad antifúngica de NPCH, GEO y GEO-NPCH contra *Fusarium* y *Aspergillus* se evaluó calculando los valores de MIC en dos escenarios diferentes. En primer lugar, se probó el efecto antifúngico de GEO-NPCH, NPCH y GEO contra las diferentes esporas antes de su germinación (Figura 4).

El valor MIC de NPCH contra el crecimiento *de F. oxysposum* fue de 10,0 mg/mL, según las concentraciones ensayadas, mientras que no se observó ninguna inhibición en las otras dos especies. Se obtuvieron valores de MIC más bajos con el tratamiento GEO, alcanzando 7,5 mg/mL contra todos los hongos ensayados. Por el contrario, el tratamiento con GEO-NPCH fue más efectivo contra todos ellos, especialmente contra *F. oxysporum* mostrando una CIM de 2,5 mg/mL seguido de *A. niger* y *A. versicolor* con una CIM de 5,0 mg/mL.

Por otra parte, la evaluación de la MIC del tratamiento con TB contra las esporas de *Fusarium* y *Aspergillus* requirió dosis más bajas que

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

iban de 0,115 m/mL a 2 mg/mL. La TB pura a dosis comerciales inhibió la germinación de las esporas de los hongos ensayados con concentraciones inferiores a 0,5 mg/mL para *A. niger* y *A. versicolor*. La recomendación comercial de TB puro fue de 9,0 mg/mL, a esta dosis se observaron efectos negativos sobre la germinación y el crecimiento de las semillas en comparación con NPCH o GEO-NPCH. Por el contrario, las semillas tratadas con nanopartículas no mostraron efectos negativos, de hecho las plántulas mostraron una mayor altura en comparación con el control, indicando así un posible efecto vigorizante ya que promueve el cercimiento.

Al encapsular el GEO en quitosano, los valores de la MIC disminuyeron, resultando en una disminución del 10% de la cantidad de GEO necesaria para generar la misma acción inhibidora contra los hongos ensayados.

Las propiedades antimicóticas de las nanopartículas se evaluaron en micelios tras la germinación de esporas (Tabla 2). Esta estrategia tiene como objetivo evaluar la eficacia del tratamiento una vez que el hongo comienza a atacar el cultivo. Los valores de MIC obtenidos fueron más bajos en comparación con las MIC obtenidas en las esporas, un resultado que era de esperar, ya que las esporas con pared celular son más gruesas que las hifas. Por ejemplo, *A. niger* fue el hongo más sensible y mostró un valor de MIC para GEO-NPCH de 0,33 mg/mL. Al utilizar el mismo tratamiento contra las esporas, el valor fue de 5,0 mg/mL. El mismo comportamiento se observó utilizando TB y GEO con un valor de MIC de 0,11 mg/mL y 0,5 mg/mL, respectivamente. Por otro lado, *F. oxysporum* mostró los mismos patrones que *A. niger* utilizando NPCH, GEO NPCH y GEO, aunque fue menos sensible a TB cuando se trataron las hifas, mostrando un valor de MIC >3,33 mg. Por último, *A. versicolor* mostró un valor de MIC de 15,0 mg/mL cuando se trató con GEO, aunque su encapsulación aumentó el efecto antifúngico de forma significativa, reduciendo su MIC a 3,33 mg/mL.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Tabla 2. Valores MIC de los tratamientos GEO-NPCH; NPCH y GEO contra las esporas de *F. oxysporum, A. niger* y *A. versicolor* después de la germinación. Los tratamientos se realizaron en placas multipocillo de medio PDB líquido a dosis más bajas. Los datos se generaron como resultado de tres experimentos independientes

	Tratamiento en esporas germinadas (mg/mL)			
Hongo	**NPCH (mg/mL)**	**GEO NPCH (mg/mL)**	**GEO (mg/mL)**	**TB (mg/mL)**
F.oxysporum	3.33	1.11	1.66	>3.33
A.niger	1.11	0.37	0.56	0.11
A.versicolor	>3.33	3.33	15.00	3.33

3.8 Efectos de la GEO-NPCH en semillas recubiertas

Para evaluar el efecto de GEO-NPCH en diferentes tipos de semillas, se evaluó un lote compuesto por 100 semillas de trigo, avena y cebada para determinar el porcentaje de germinación tras 7 y 15 días de tratamiento con GEO-NPCH, con TB y semillas no tratadas como control (tabla 3). Después de 7 días, la tasa de germinación más alta se observó en la cebada, y todos los tratamientos alcanzaron valores cercanos al 99% de germinación. Las semillas no tratadas mostraron valores similares. En la avena, GEO-NPCH mostró un mayor porcentaje de germinación, alcanzando el 99,7% en comparación con TB, mostrando un efecto sobre la germinación igual a los obtenidos en las semillas no tratadas. Por otra parte, las semillas de trigo no tratadas mostraron una tasa de germinación del 82%, mientras que las semillas tratadas con TB y GEO-NPCH alcanzaron tasas de germinación más altas, con un 93,0% y un 90,3% respectivamente.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de semillas de cebada, trigo y avena después de diferentes tratamientos

Cereal/ Tratamiento	**Germinación %**	**Cereal/ Tratamiento**	**Germinación %**	**Cereal/ Tratamiento**	**Germinación %**
Cebada/NT	98.7±0.58	Trigo/NT	82.0±1.15	Avena/NT	95.3±0.58
Cebada/ NPCH	98.3±0.79	Trigo /NPCH	87.7±1.52	Trigo /NPCH	98.7±1.53
Cebada/ GEO-NPCH	98.3±0.84	Trigo/ GEO-NPCH	90.3±1.53	Trigo/ GEO-NPCH	99.7±0.47
Cebada/TB	98.7±0.42	Trigo /TB	93.0±5.20	Trigo /TB	95.3±0.63

NT: No tratados

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Por el contrario, el lote de semillas evaluado a los 15 días (Fig. 5.) mostró características morfológicas diferentes en función del tratamiento utilizado. Las semillas tratadas con TB consumieron todos los recursos energéticos, al igual que ocurre en otras especies como el maíz, donde los tratamientos convencionales con TB producen reducciones en la altura de los brotes, en el peso fresco de los brotes y en la raíz fresca, señalando que la supresión del desarrollo del maíz inducida por TB fue exponencialmente dependiente de la dosis (Yang et al., 2014). Además, los datos presentados en la Fig 6A mostraron que GEO-NPCH en dosis de 7,6 mg/mL y 2 mg/mL tienen un peso total significativamente mayor ($p < 0,05$) que las semillas de TB a 10 mg/mL de TB pura. Los tratamientos NPCH también mostraron un aumento más significativo ($p < 0,05$) en el peso total que las semillas de TB (Fig. 6B). La longitud de las raíces aumentó significativamente ($p < 0,05$) con el tratamiento con GEO-NPCH en comparación con el control no tratado, la TB y el NPCH.

Del mismo modo, GEO-NPCH a 7 mg/mL muestra un aumento en la longitud total de las hojas (Fig. 6C) y un crecimiento significativo ($p < 0,05$) de las partes verdes en las hojas (Fig. 6 D) en comparación con

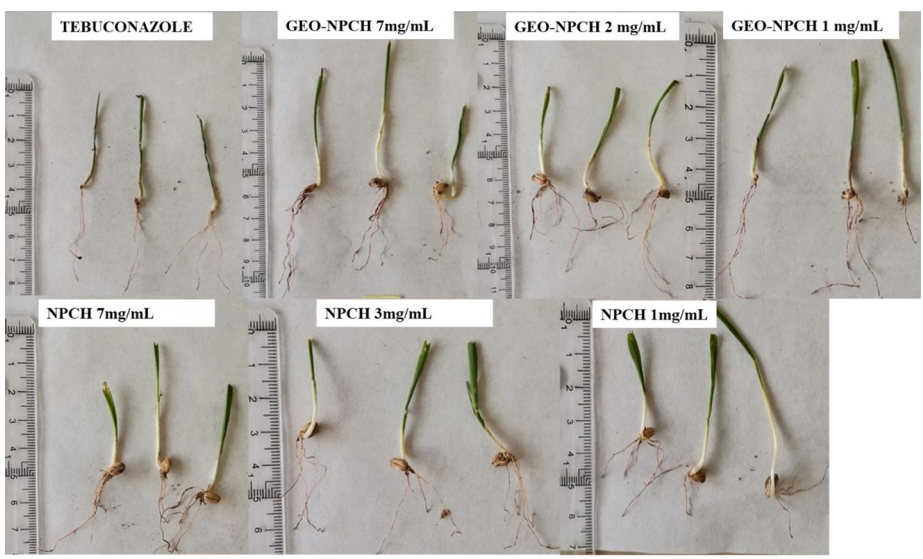


Figura 5. Plántulas de trigo 15 días después de la siembra; GEO-NPCH 7mg/mL (0,7 mg/mL de GEO puro), GEO-NPCH 2 mg/mL (0,2 mg/mL de GEO puro), GEO-NPCH 1 mg/mL (0,1 mg/mL de GEO puro)

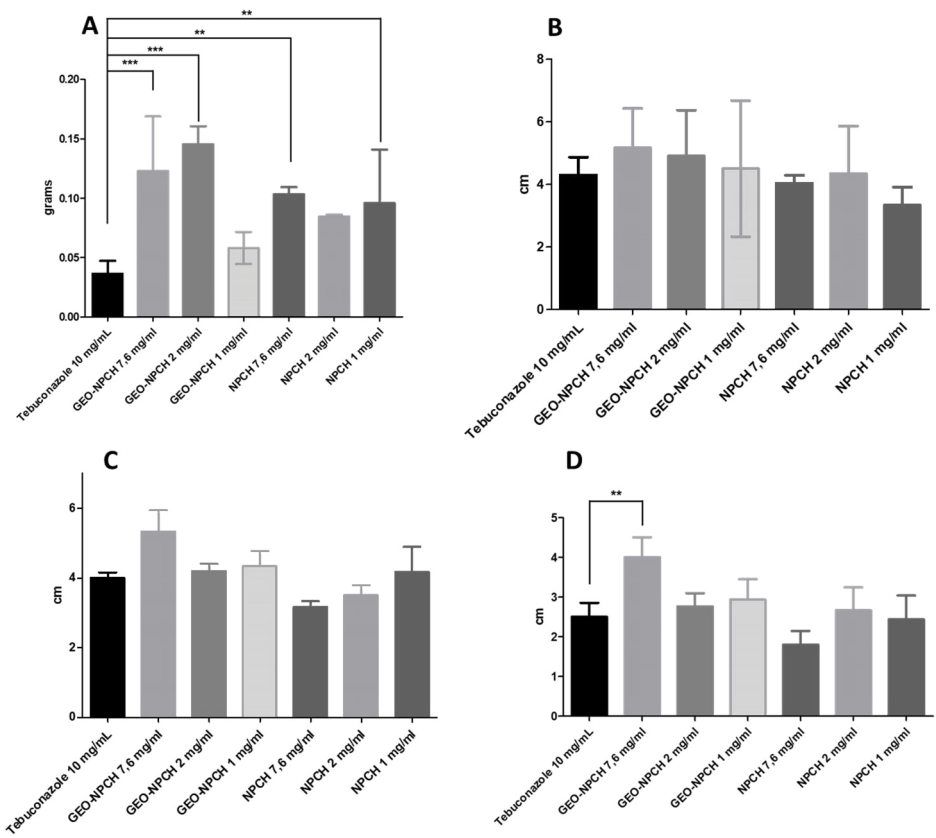
Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

los otros tratamientos, lo que sugiere que GEO-NPCH puede promover la germinación y el crecimiento de las semillas de trigo en condiciones de campo. Los metabolitos secundarios pueden afectar a la germinación de las semillas y a la productividad de las plantas, ya que los aceites esenciales contienen compuestos bioactivos, como los monoterpenos y los sesquiterpenoides, que pertenecen a compuestos aleloquímicos y están implicados en muchos procesos metabólicos y ecológicos. Dosis bajas de aleloquímicos promueven el crecimiento y mejoran la liberación mediada por el ácido jasmónico de los cultivos objetivo, estimulando respuestas de estrés leves. Este fenómeno se conoce como cebado de la semilla, que implica el tratamiento de la semilla con agentes estresantes transitorios durante la primera fase de hidratación del proceso de cebado dentro de los embriones, lo que conduce a un incremento de estrés de memoria y a una adaptación más eficiente a episodios posteriores de estrés. (Rentzsch et al., 2012), (Dudai et al., 2004) En hallazgos anteriores, el recubrimiento de las semillas con aceite esencial activó la germinación de las semillas y la promoción del crecimiento derivada del efecto beneficioso de la acidificación transitoria de los endospermos y embriones de las semillas inducida por los monoterpenos presentes en el Eos, lo que conduce a un aumento de la permeabilidad de las membranas, y la generación de ROS (Ben-Jabeur et al., 2019). La acidificación del endospermo y del embrión de la semilla produce múltiples efectos como la alteración del efecto inhibidor del ABA, la acidificación del citosol, y la estimulación de la bomba electrogénica de protones favoreciendo las tasas de germinación, el agrandamiento celular, y la elongación de la plántula (Blankenship et al., 2014), (Brummer et al., 1984), solubilizando el almidón, y la movilización de macronutrientes durante la germinación (Hamabata et al., 1988); o el debilitamiento de las barreras de membrana de las células del endospermo, permitiendo una mayor captación de agua que conduce a la interrupción de la latencia, y la promoción de la germinación y el crecimiento. Además, el uso de quitosano como materia prima para generar las nanopartículas conduce a la acumulación de fitoalexinas, proteínas relacionadas con patógenos (PR) e inhibidores de proteinasas, la síntesis de lignina y la formación de calosa, produciendo un efecto vigorizante

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

en las plantas tratadas (Hadrami et al., 2010). Nuestros hallazgos coinciden con resultados anteriores, en los que los tratamientos de semillas modifican las características de emergencia de las semillas sembradas en los campos. Por otra parte, dosis más bajas de tratamiento de semillas con quitosano podrían estimular el crecimiento de los brotes, como se ha descrito en el trigo (Li et al., 2019) y el garbanzo (Sathiyabama & Parthasarathy, 2016).

Figura 6. Evaluación de los cambios morfológicos después del tratamiento de las semillas de trigo; A) Peso total (gramos); B) Longitud de la raíz; C) Longitud total de las hojas; D) Longitud de la parte verde de las plántulas de trigo con 15 días



Los asteriscos indican la significación estadística de las diferencias entre los distintos tratamientos y Tebuconazol 10 mg/ml utilizando el ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet (*- $p < 0,05$, **-$p < 0,01$ y ***-$p < 0,001$).

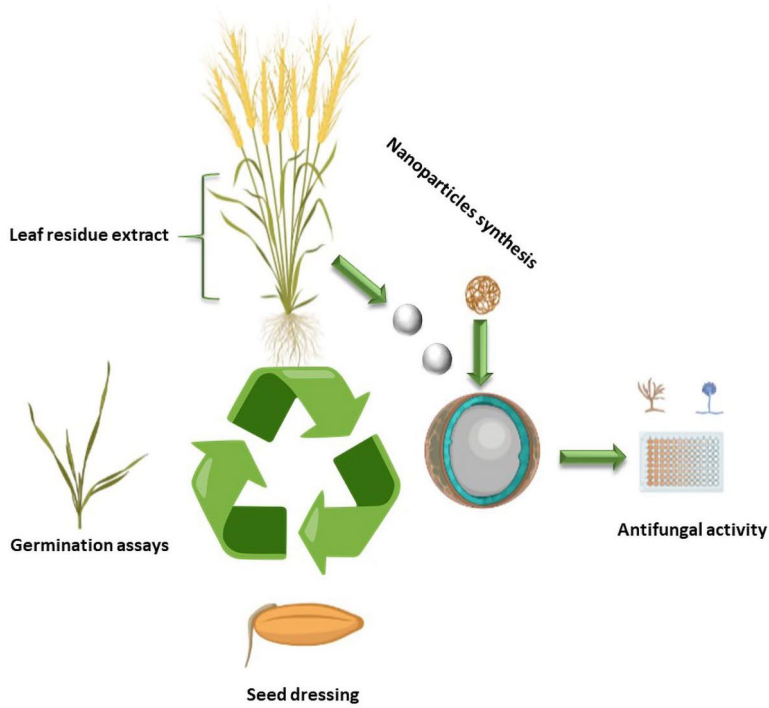
Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

4. Conclusión

Las actividades fungicidas y fungistáticas del aceite esencial de una de las materias primas más interesantes desde el punto de vista cultural, sanitario y económico de la región como es el ajo, junto con el conocimiento de sus usos tradicionales y nuevos con la creciente literatura sobre sus mecanismos de acción, los han convertido en una alternativa atractiva a los fungicidas sintéticos. El éxito del uso del aceite esencial como fungicida es probablemente el resultado de la sinergia de múltiples compuestos, haciéndolos más efectivos contra los hongos patógenos de las plantas. Nuestros datos revelaron que la combinación de GEO y NPCH aumenta la capacidad fungicida del GEO disminuyendo la CIM de 7,5 mg/mL (GEO puro) a 2,5 mg/mL (GEO-NPCH) en F. oxysporum con un 10% de GEO en esta dosis (0,25 mg/mL de GEO puro). Esta actividad es similar a la de la TB, sin embargo, el uso de TB disminuye la germinación de las semillas de trigo mientras que el recubrimiento de las semillas con GEO-NCPH mejoró la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas. En general, el recubrimiento de semillas con GEO-NCPH es un enfoque alternativo prometedor que surge desde nuestra provincia a través del reaprovechamiento de los residuos generados, para superar las enfermedades fúngicas y promover en la planta un mayor potencial de rendimiento. Por otro lado, el GEO-NPCH es una alternativa ecológica ya que no es dañino debido a su origen natural, lo cual hace que sea más probable que sea aceptado por los consumidores que los agentes sintéticos. Además, el aceite esencial y los extractos de plantas en general se degradan más rápidamente que la mayoría de los fungicidas químicos y son ecológicos y tienen menos probabilidades de matar a los hongos beneficiosos que los fungicidas sintéticos con mayor retención en el medio ambiente.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

CAPÍTULO 2
NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOGÉNICA RECUBIERTAS DE QUITOSANO A PARTIR DE RESIDUOS DE TRIGO ALBACETENSE COMO ANTIFÚNGICO VERDE Y NANOPRIMIG EN SEMILLAS DE TRIGO



Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

1. Introducción

Los cultivos de cereales, especialmente el trigo, la cebada y el maíz, son la base del suministro de alimentos, no sólo en la provincia de Albacete, sino del mundo. Por consiguiente, la mejora de los medios de conservación y producción son puntos clave para lograr una agricultura sostenible. Sin embargo, las pérdidas ocasionadas por infecciones fúngicas son del 15%-20%, e incluso ascienden hasta el 60% (Rózewicz et al., 2021). Estas infecciones pueden afectar a la apariencia, olor o germinación de la semilla, causando grandes pérdidas económicas y de suministro, entre otros inconvenientes. Además, los hongos de los géneros *Aspergillus, Fusarium y Penicillium* secretan metabolitos secundarios fitotóxicos, denominados micotoxinas, los cuales provocan retraso en el crecimiento de las plantas, muerte celular, interrupción de la mitosis y cambios en el metabolismo de las proteínas (Fan et al., 2021). Se estima que estos metabolitos secundarios están ampliamente presentes (60% - 80%) en los cultivos del mundo. Las micotoxinas conocidas más importantes son: ocratoxinas, fumonisinas, deoxyvalenol y aflatoxinas. Dentro de éstas, las aflatoxinas son especialmente relevantes, dado su potencial carcinogénico en humanos (Jia et al., 2020). Además, pueden causar neurotoxicidad, dermatotoxicidad, teratogenicidad, estrogenicidad, efectos inmunosupresores, hepatotoxicidad y mutagenicidad (Khodaei et al., 2021).

Como se comentó en el anterior capitulo, la Unión Europea ha prohibido el uso de muchos plaguicidas, aunque se siguen utilizando algunos fungicidas pertenecientes al grupo de los triazoles de amplio espectro. Este grupo se utiliza sobre todo para tratar las semillas de los cultivos de cereales (Fernández-Vizcaíno et al., 2020). El tebuconazol, el flutriafol o

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

el difenoconazol son compuestos que se encuentran en el grupo de los triazoles y son capaces de actuar como disruptores endocrinos, capaces de modificar la síntesis de hormonas reproductivas, y disminuir la capacidad reproductiva en el caso de la perdiz roja (Fernández-Vizcaíno et al., 2022). El tebuconazol no sólo afecta a la población de aves granívoras, sino también a mamíferos como los roedores, esto es debido a alteraciones de los niveles de hormonas esteroideas y variaciones en la reproducción (aumento del periodo de gestación, reducción del peso corporal de las crías, feminización de los machos y virilización de las hembras) (López-Antia et al., 2021).

Debido a los inconvenientes mencionados del tebuconazol y otros fungicidas relacionados, es necesario buscar alternativas con propiedades antifúngicas respetuosas con el medio ambiente y más seguras para los seres vivos. Ciertos aceites esenciales y terpenos tienen capacidad antifúngica, actuando como desestabilizadores de membranas e induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, estos compuestos son altamente volátiles, tienen baja solubilidad en agua y son inestables en condiciones de luz y oxígeno (Niza et al., 2020) (Mondejar et al., 2022). Debido a su inestabilidad, la encapsulación de estos compuestos es un método adecuado para mejorar su utilidad, potenciando su actividad antimicrobiana y consiguiendo una liberación controlada de los compuestos activos (Hadidi et al., 2020). Polímeros como el quitosano, compuesto por unidades de β-(1-4)-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, son ampliamente utilizados en nanotecnología debido a su capacidad para formar geles, películas y nanopartículas sólidas, lo que los hace ideales para aplicaciones en cultivos. Igualmente, su biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades antifúngicas permiten su uso en la agricultura ecológica (Mondéjar-López et al., 2021). El quitosano actúa especialmente como elicitor, siendo capaz de estimular la respuesta inmune de la planta, además de aportar propiedades antivirales y antimicrobianas (Pal et al., 2021).

El nanopriming o nanoimpregnación/nanoimprimación de semillas es un tratamiento previo a la siembra, en el cual se sumergen las semillas en una concentración específica de una suspensión definida de

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

nanopartículas durante un periodo concreto. Dicho tratamiento crea un estado fisiológico en la semilla, reforzando su capacidad de crecimiento contra el estrés biótico o abiótico. El nanopriming puede acelerar la tasa de germinación, la velocidad de germinación, el índice de vigor de las plántulas, la elongación de las raíces y los brotes, el peso húmedo y seco de las plántulas, la tasa fotosintética y otros rasgos de crecimiento de las plantas (Abbasi Khalaki et al., 2021).

Las nanopartículas de plata (AgNP) se encuentran entre los nanomateriales más utilizados. Estas nanopartículas se utilizan ampliamente por sus propiedades antimicrobianas en muchos campos, como la cosmética, la medicina y la alimentación (He et al., 2021). Sin embargo, el uso en plantas de las AgNP sintetizadas químicamente se ha asociado con cierto grado de fitotoxicidad que afecta a caracteristicas morfológicas, fisiológicas, celulares y moleculares (Vannini et al., 2014). Estos problemas están directamente influenciados por las propiedades físicas y químicas de las AgNP, particularmente el tamaño, la forma o la concentración de exposición (Xue et al., 2019) (Yan & Chen, 2019). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la exposición de nanopartículas de plata (AgNPs), obtenidas mediante el uso de la química verde, a niveles óptimos, puede mejorar el crecimiento de las plantas durante las primeras etapas, y proteger los cultivos del estrés ambiental (Mahakham et al., 2017). Además, la síntesis verde ofrece numerosas ventajas, como el ahorro de tiempo, la rentabilidad y el respeto al medio ambiente, evitando los residuos peligrosos capaces de contaminar la atmósfera (Soliman et al., 2020).

Por consiguiente, en este estudio proponemos, por primera vez, un método alternativo de nanoimpregnación de semillas, a través de la obtención de nuevas nanopartículas obtenidas bajo un proceso de economía circular, combinando quitosano junto con nanopartículas de plata biogénica obtenidas a partir del extracto de trigo (de la misma especie) por medio de la reutilización de residuos de cultivos de trigo generados en la provincia de Albacete. Todo ello con el fin de probar sus usos en las semillas de trigo mediante la determinación de su actividad antifúngica y la evaluación de su efecto sobre la germinación de las semillas y la fotosíntesis.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

2. Materiales y métodos

2.1 Material

Nitrato de plata (AgNO3), quitosano de bajo peso molecular (CH) (50-190 kDa) con un grado de desacetilación del 75-85 %, tripolifosfato (TPP), bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT), tebuconazol (TB) y todos los disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Orius 20 EW (20% de tebuconazol) de Nufarm España. Los organismos utilizados para los ensayos antifúngicos consistieron en especies de *Aspergillus versicolor, A. niger y Fusarium oxysporum,* que se aislaron del suelo y se examinaron visual y microscópicamente para la caracterización morfológica de los aislados, como se describe previamente en (Palmero et al., 2014) y se confirmó su identidad mediante la secuenciación del ITS como se describe en Gardes y colaboradores (Gardes et al., 1993).

2.2 Preparación del extracto vegetal

Las hojas de trigo liofilizadas se pulverizaron. Posteriormente, se añadió 1 gramo a 100 mL de agua miliQ, y se mantuvo en una placa calentada durante 15 minutos a 80 °C. El extracto acuoso se filtró a través de un filtro millipore de 0,45 µM y se almacenó a -20 °C.

2.3 Contenido de flavonoides y polifenoles en el extracto de hoja de trigo

2.3.1 Determinación de los polifenoles totales

Para determinar la cantidad total de polifenoles en el extracto acuoso, se llevó a cabo el método de Folin-Ciocalteau (Lin & Tang, 2007). Brevemente, se mezclaron 0,1 mL de extracto acuoso con 2 mL de Na_2CO_3 al 2%, 2,8 mL de H2O y 0,1 mL de reactivo Folin-Ciocalteau. Tras la mezcla, se midió el cambio de color mediante la absorbancia a 750 nm. Se utilizó el ácido gálico (GAE) como estándar a diferentes concentraciones (10-200 ppm). El experimento se llevó a cabo en n=3.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

2.3.2 Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides en el extracto acuoso se determinó mediante un método colorimétrico con el uso de $AlCl_3$*$6H_2O$ (Lin & Tang, 2007). Brevemente, se mezclaron 0,5 mL de extracto acuoso con 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de $AlCl_3$*$6H_2O$ al 10%, 0,1 mL de CH_3COOK 1 M y 2,8 mL de H_2O. Después de mezclar, se evaluó el cambio de color a 415 nm. Se utilizó quercetina (QE) como estándar a diferentes concentraciones (8-500 ppm). El experimento se realizó por triplicado.

2.4 Síntesis de nanopartículas biogénicas de plata recubiertas de quitosano (AgNP-CH)

2.4.1 Síntesis de AgNP

La síntesis de AgNP se realizó como se ha descrito previamente (Mondéjar-López et al., 2021) con diferentes modificaciones; se añadieron 10 mL de 25 mM de $AgNO_3$ gota a gota a una velocidad de flujo de 2 mL/min en 10 mL de extracto acuoso de trigo bajo alta agitación. La suspensión se mantuvo en agitación continua bajo luz blanca, controlando el cambio de color (solución blanquecina a marrón oscuro) de la suspensión con el tiempo. Las AgNP se recogieron tras centrifugarlas a 15.000 g durante 15 minutos a 4 °C y se lavaron varias veces con agua miliQ, para su posterior liofilización a -40 °C.

2.4.2 Recubrimiento de quitosano de las nanopartículas de plata (AgNP-CH)

El recubrimiento de quitosano de las nanopartículas de plata se hizo como se describió previamente (Mondéjar-López et al., 2021) con algunas modificaciones: Se añadieron 10 mL de $AgNO_3$ 25mM gota a gota a una velocidad de flujo de 2 mL/min en 10 mL de extracto de la planta bajo agitación alta. La suspensión se mantuvo en agitación continua bajo luz blanca durante 1 hora. Durante este tiempo, se observó un cambio de color de amarillo a marrón-negro. Las AgNPs se recogieron después de centrifugar a 15000 g durante 15 minutos a 4 ºC. El pellet de AgNPs se resuspendió en 1 mL de agua miliQ y se añadió gota a gota en 16 mL

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

de solución de quitosano a 2 mg/mL en ácido acético al 1% bajo agitación vigorosa. La suspensión de recubrimiento se mantuvo en agitación continua durante 6 horas en condiciones de oscuridad. Las AgNP-CH se recogieron tras centrifugarlas a 15000 g durante 15 minutos a 4ºC. Las nanopartículas recubiertas se lavaron varias veces con agua miliQ y se liofilizaron a -40ºC.

2.5 Caracterización de las nanopartículas

2.5.1 Análisis del espectro UV-vis

La formación de AgNP biogénicas se observó midiendo el espectro UV-vis de la mezcla de reacción frente al extracto acuoso de trigo como blanco. El análisis espectral se realizó utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer de doble haz con una resolución de 1 nm desde 300 nm hasta 700 nm.

2.5.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y reflectancia total

Para evaluar la incorporación de quitosano que rodea a las AgNP, se registró el espectro IR en un espectrofotómetro de reflectancia total atenuada-infrarrojo con transformada de Fourier (ATR-FTIR) (VARIAN 640-IR con una placa de cristal de rendimiento Pike Diamond/KRS-5 HS) y se indicaron los picos principales en cm^{-1}. El ATR nos permite utilizar las muestras directamente en estado sólido o líquido sin necesidad de matriz de KBr o yodo de lugol. En concreto, para la muestra de AgNP-CH, se resuspendieron 20 mg de nanopartículas en una solución acuosa. Posteriormente, se colocaron 200 µl en la placa y la punta se colocó de forma que la tensión superficial de la gota cubriera la placa de diamante de forma homogénea. Se adquirieron 256 escaneos con una resolución del instrumento de 1 cm^{-1} en el rango espectral entre 650 y 4000 cm^{-1} debido al corte de frecuencia del elemento de reflexión interna (IRE) del ATR-FTIR utilizado.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

2.5.3 Medidas del tamaño de partícula

La caracterización de las partículas de las nano-formulaciones (tamaño, potencial zeta e índice de polidispersidad (PDI)) se determinó mediante espectroscopia de correlación de fotones a través de dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un Zetasizer (3000HSM Malvern Ltd, IESMAT, España) con las siguientes especificaciones para AgNP-CH: índice de refracción (IR) del quitosano de 1,700, índice de absorción 0,010 y RI del disolvente agua: 1,33, con una viscosidad de 0,8872 cP. Las medidas se realizaron por triplicado.

2.5.4 Estudios de morfología y composición de las AgNP-CH

Las imágenes del microscopio electrónico de alta resolución se obtuvieron en un microscopio TEM Jeol JEM 210 que funcionaba a 200 kV y estaba equipado con un detector Oxford Link EDS. Las imágenes resultantes se analizaron utilizando el software Digital Micrograph™ de un microscopio Gatan. que funcionaba a 200 kV y estaba equipado con un detector Oxford Link EDS. Las imágenes resultantes se analizaron utilizando el software Digital Micrograph™ de Gatan.

2.6 Determinación de la actividad antifúngica de las nanopartículas sintetizadas

El ensayo antifúngico frente a las esporas se realizó según (Mondejar et al., 2022), con algunas modificaciones. La suspensión de esporas a una concentración de 3 x 104 esporas/mL (100 µL) se transfirió a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las placas se incubaron 24 h a 28 ºC y se añadieron los tratamientos mediante el método de dilución en serie. Las placas se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente y todas se trataron con 10 µL de bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT; 5 mg/mL en PBS; Sigma). Por último, las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente, seguida de la adición de 100 µL de disolvente de MTT (0,1 NHCl en alcohol isopropílico anhidro).

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

2.7 Eliminación de radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad de eliminación de radicales libres (FRS) se determinó como se ha descrito previamente (Mondéjar-López et al., 2022). Brevemente, se mezclaron 0,5 mL para cada concentración (1,4 mg/mL, 720 µg/mL, 360 µg/mL, 180 µg/mL y 90 µg/mL) de AgNP y AgNP-CH sintetizadas con una solución etanólica de radicales DPPH 0,1 mM (1,5 mL), posteriormente se mezcló y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia de la solución se midió a 517 nm. El indicador de la actividad antioxidante se calculó mediante % = (A0 - A1/A0) × 100, donde A0 es la absorbancia a tiempo cero y A1 es la absorbancia después de 30 min de incubación.

2.8 Evaluación del AgNP-CH biogénico como agente de recubrimiento de semillas

Para evaluar el efecto de las AgNP como agente de recubrimiento de semillas a dosis antifúngicas, se evaluaron las tasas de germinación de las diferentes semillas. Así pues, se recubrieron tres lotes de 100 g de semillas de trigo (*Triticum vulgare*) sin esterilización previa con 1,6 mL de cada tratamiento. Se utilizaron 100 g de semillas sin tratamiento, 100 g de semillas tratadas con AgNP y AgNP-CH a dosis máximas de MIC y 100 g de semillas tratadas con TB a dosis comerciales (9 mg/mL de TB pura). Tras el recubrimiento, las semillas se secaron a temperatura ambiente. Se colocaron lotes de 100 semillas de cada cereal en papel de filtro húmedo estéril y se incubaron a 25 ºC durante 5-7 días en una cámara de germinación a 21,8 ºC, con una duración del día de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. El efecto sobre la germinación de las semillas se evaluó contando el número de semillas viables. El experimento se realizó por triplicado.

Para determinar el efecto sobre la morfología y el potencial de fitotoxicidad durante la germinación, realizamos pruebas de germinación en maceta con semillas tratadas a las dosis y condiciones de germinación indicadas anteriormente. Después de 5 a 7 días en la germinación de las semillas, se evaluaron los brotes midiendo el peso, la longitud de las raíces y la longitud de las hojas en cm. En este experimento se analizaron al menos 35 semillas por grupo. El análisis estadístico de los datos

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

significativos se evaluó mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc de comparación múltiple de Dunnett.

2.8.1 Determinación del contenido de clorofila en las plantas tratadas

El contenido total de clorofila en las hojas de las plantas de las semillas tratadas se evaluó como (Asimovic et al., 2016) con algunas modificaciones. Concretamente, se extrajeron 50 mg de hojas en polvo con 300 μL de acetona al 80%. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 10 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 662 y 644 nm. Los análisis estadísticos de los datos significativos se evaluaron mediante ANOVA de una vía y pruebas post hoc de Bonferroni.

3. Resultados y discusión

3.1 Polifenoles y flavonoides en el extracto de hoja de trigo

Los contenidos de polifenoles, flavonoides, glucosa y otras moléculas presentes en los extractos de plantas, son los agentes reductores principales para la producción de nanopartículas de plata, acentuándose gracias a la química verde después de reaccionar con nitrato de plata como precursor de plata (Castillo-Henríquez et al., 2020). Diferentes estudios han utilizado polifenoles y flavonoides como precursores para la síntesis de nanopartículas de plata (Mondéjar-López et al., 2021) (Swilam & Nematallah, 2021). En este estudio, realizamos un extracto acuoso de hoja de trigo y evaluamos el contenido de polifenoles y flavonoides. Los resultados mostraron un contenido total de polifenoles en el extracto acuoso de hoja de trigo es de 35,07 mg de EAG (equivalente de ácido gálico)/gr de peso seco, y el contenido total de flavonoides de 13,64 mg de EQ (equivalente de quercetina)/gr de peso seco. Otros extractos de trigo blando y trigo duro mostraron un contenido máximo de polifenoles totales de 120 mg de EAG/100 gr y un contenido total de flavonoides de 30 mg de EQ/100 gr para cada variedad, (Heimler et al., 2010), mostrando niveles más bajos que nuestros extractos.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

3.2 Síntesis y caracterización de las AgNP-CH biogénicas

La biosíntesis de las nanopartículas de plata se llevó a cabo utilizando el extracto acuoso de hoja de trigo, actuando como precursor de agentes reductores para formar AgNP a partir de nitrato de plata. Tan pronto como se añadió la solución de $AgNO_3$ al extracto acuoso de la hoja, en condiciones de agitación vigorosa, el color de la solución de nitrato de plata cambió rápidamente de amarillo claro a una solución marrón, lo que indica la formación de AgNP. El color marrón se debe a la excitación de electrones libres en las nanopartículas y se produce en 60 minutos a temperatura ambiente, bajo luz blanca. Después de 24 horas, no se detectó ningún otro cambio de color con motivo de la estabilización de las nanopartículas sintetizadas. No se observaron cambios de color cuando las nanopartículas de plata se añadieron a la solución de quitosano.

Para evaluar las nanopartículas de plata bio-sintetizadas a través de la síntesis verde utilizando el extracto acuoso de hoja de trigo, se realizó un barrido UV-visible de 300 a 750 nm para confirmar la presencia de nanopartículas en la muestra, basándose en su espectro de resonancia de plasmón superficial localizado. Se registraron los espectros de absorción de las nanopartículas de plata sintetizadas frente al agua. La reducción

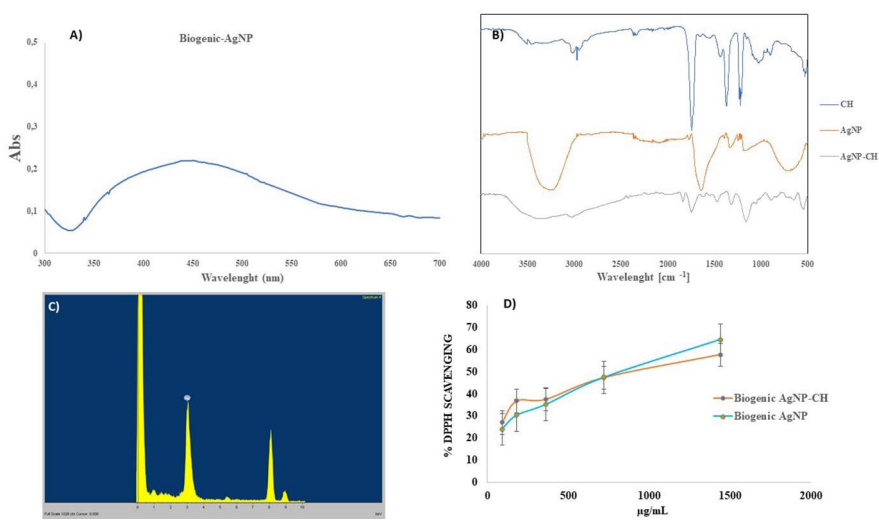


Figura 1. A) Resonancia plasmónica superficial localizada de las nanopartículas de plata biogénica observada en el espectro UV-Vis, B) Análisis ATR-FTIR de AgNP de quitosano y AgNP-CH; C) Análisis elemental de AgNP-CH; D) Ensayo DPPH de AgNP y AgNP-CH

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

de los iones de plata, y la formación de nanopartículas de plata se confirmó mediante los espectros UV-visibles, donde la absorbancia máxima se observó a 450 nm (Figura 1 A)) como se muestra en las nanopartículas de plata obtenidas de *Iris tuberosa* L. (Mondéjar-López et al., 2021), y otros extractos de plantas como *Berberis vulgaris* Vell., *Brassica nigra* W.D.J.Koch, *Capsella bursa-pastoris* Medik., *Lavandula angustifolia* Moench y *Origanum vulgare* L. (Salayová et al., 2021). El extracto acuoso de hoja de trigo actúa como agente reductor mediando la síntesis, y sus biomoléculas naturales actúan como agentes de recubrimiento y estabilización de las nanopartículas de plata mejorando su biocompatibilidad (Della Pelle et al., 2018).

3.3 Análisis FT-IR de AgNP-CH biogénicas

La incorporación de quitosano en la superficie de AgNP-biogénicas, se evaluó mediante análisis FTIR (Figura 1 B)). El accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) nos permitió identificar los principales grupos funcionales, y las biomoléculas que actúan como agentes captores presentes directamente de las nanopartículas y el quitosano. En la figura 2 se muestran los espectros de quitosano, AgNP y AgNP-CH. En el quitosano, se observó claramente una banda ancha entre 3750 cm^{-1} y 3200 cm^{-1}, asociada al estiramiento de los enlaces O-H y N-H. En cuanto a AgNP-CH, se observaron picos característicos adicionales del quitosano en 2916 cm^{-1} y 3009 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C-H del carbono sp^3, 1739 cm^{-1} con motivo del estiramiento del carbonilo C=O de la amida (Gedam & Dongre, 2015). Así pues, la evidencia muestra que las nanopartículas estaban recubiertas de quitosano. Por otra parte, se detectó un pico amplio de 3503 cm^{-1} a 2975 cm^{-1} en la AgNP, correspondiente a la presencia de agentes de recubrimiento como el alcohol y los fenoles (vibración de estiramiento O-H 3503 cm^{-1}), y el estiramiento C-H de los compuestos aromáticos (2975 cm^{-1}) (Jyoti et al., 2016) se superponen por la incorporación de quitosano en la AgNP-CH. La presencia de proteínas que rodean a la AgNP se revela por el pico a 1637 cm^{-1}, que corresponde al estiramiento C-N y C-C (Prakash et al., 2013). Sin embargo, en el caso de las AgNP-CH los procesos de recubrimiento impiden que este pico

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

aparezca en el espectro de estas nanopartículas, lo que reafirma la eficacia del proceso de recubrimiento con quitosano.

3.4 Tamaño y carga superficial de las nanopartículas

Se aplicó la técnica DLS para determinar la dimensión de las nanopartículas y la uniformidad de las nanoformulaciones (Mondéjar-López et al., 2022). Los resultados del tamaño de las partículas y el PDI de las nanoformulaciones se presentan en la Tabla 1.

Tabla 2. Tamaño medio, polidispersidad (PDI), potencial Z, eficiencia de encapsulación (EE) y eficiencia de carga (LE) para la caracterización de las NP. Los datos se expresan como media ± e.e.m. de al menos tres experimentos independientes

Formulación	Diámetro (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
AgNP	116.4±4.10	0.3±0.02	-27.5±0.83
AgNP-CH	154.7±7.62	0.3±0.02	+43.6±3.06

Los resultados mostrados en la Tabla 1 revelaron un incremento del tamaño medio tras el recubrimiento con quitosano de las nanopartículas de plata, aumentando de 116,4 nm a 154,7 para AgNP y AgNP-CH respectivamente, demostrando así un recubrimiento eficiente de las nanopartículas. El índice de polidispersidad (PDI) confirma una suspensión monodispersa de ambas nanopartículas biogénicas en suspensiones de agua, con valores de PDI<0,5 (Modéjar-López et al., 2022). Los tamaños mayores detectados son consecuencia de la agregación de las nanopartículas más pequeñas, lo que ha sido confirmado por el análisis TEM en varios estudios, dando lugar a un alto valor de PDI. Varios estudios indican un tamaño de partícula similar de las AgNP, que oscila entre 10-800 nm, como se describe en los extractos de neem, cebolla y tomate, con un PDI entre 0,2-1,0 (Chand et al., 2019).

El potencial zeta es un factor crucial para la estabilidad de las nanopartículas en medios acuosos, con valores cercanos a >30 mV y < -30 mV, de tal manera que exista suficiente repulsión eléctrica como para evitar la agregación de las nanopartículas, y obtener así una suspensión de nanopartículas más estable (Dalenc et al., 1997). Los resultados mostrados en la Tabla 1 confirman el éxito del recubrimiento de quitosano sobre las

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

nanopartículas de plata, con el aumento del potencial Z a carga superficial positiva, con un incremento de los valores de -27,5 mV a +43,6 mv para AgNP y AgNP-CH respectivamente, indicando suspensiones estables y monodispersas (Samimi et al., 2019). Otros estudios con nanopartículas de plata sintetizadas por el extracto de la flor de *Madhuca longifolia* J.F.Macbr., muestran valores de potencial Z de -4,68 mV, lo que demuestra una menor estabilidad en medios acuosos (Patil et al., 2018). Las formulaciones de Carvacrol y Eugenol-nanopartículas de quitosano mostraron valores de potencial Z de hasta +29,4 mV y +25,9 mV respectivamente, confirmando la carga superficial positiva asignada a la presencia del quitosano como materia prima en la nanoformulación (Mondéjar-López et al., 2022). Otro estudio realizado sobre nanopartículas de poli-lactida con el polímero policationico ramificado polietilenimina, mostró la misma tendencia con el aumento del valor del potencial Z de -14,4 mV a 54,7 mV (Niza et al., 2020).

3.5 Morfología y análisis elemental de las nanopartículas biogénicas de AgNP-CH

Las técnicas de microscopía electrónica son las más habituales para evaluar la morfología, las dimensiones, las características superficiales y la arquitectura de los nanomateriales. El microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés), se utilizó para conocer el tamaño, la distribución y la morfología de las AgNP-CH biogénicas. Las imágenes TEM de la fig. 2) muestran una nanopartícula esférica con un rango de tamaño de 2 - 10 nanómetros con una distribución estrecha. Ambas imágenes muestran algunas agregaciones de las nanopartículas, lo que confirma que el mayor tamaño obtenido por las medidas DLS se debe a la agregación de las nanopartículas en las condiciones de preparación de la muestra. La Fig. 2 muestra una menor agregación de las nanopartículas que podría producirse por la estabilización del quitosano en la superficie de las nanopartículas, produciendo una repulsión entre las mismas, debido a la carga superficial positiva de las nanopartículas. En otros trabajos, el uso de quitosano como agente de recubrimiento en otras nanopartículas metálicas, como el oro, mostró una mejora de las

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

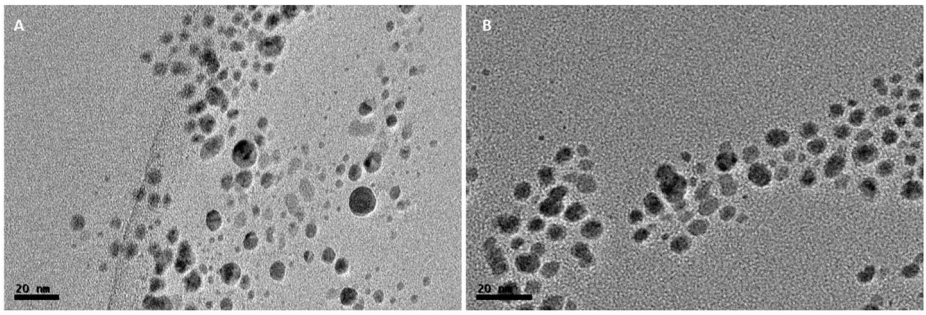


Figura 2. Imágenes al microscopio electrónico de transmission de A) AgNP y b) AgNP-CH

propiedades de estabilidad en comparación con las típicas nanopartículas de citrato-oro (Franconetti et al., 2019).

El análisis por dispersión de energía de rayos X (EDAX) es una técnica analítica espectrofotométrica de superficie utilizada en el análisis elemental de nanomateriales (Raval et al., 2018). La imagen de la Fig 1 C) muestra el espectro EDAX de la AgNP-CH. La presencia de un pico distinto a 3 keV en el espectro EDAX corresponde a las energías de unión de la plata y confirma la formación de nanopartículas de plata, de acuerdo con el estudio de espectroscopia UV-Vis (Varadavenkatesan et al., 2019).

3.6 Actividad antifúngica de las nanopartículas de plata biogénicas

Las infecciones fúngicas de los cultivos de cereales suponen un riesgo importante para la seguridad alimentaria mundial, tanto por la reducción de la producción y la calidad del grano, como por la contaminación de los piensos y los productos de consumo humano (Liu et al., 2022). El tizón de la cabeza de Fusarium es la enfermedad más dañina que afecta a los cultivos de trigo, mientras que otros hongos del género Fusarium también pueden causar otra serie de efectos patógenos: marchitez de las plántulas, podredumbre de las raíces o enfermedad extendida de raíz-corona-tallo basal, además de las diferentes enfermedades de los cereales causadas por los hongos mencionados (Modéjar-López et al., 2022).

La búsqueda de nuevos métodos alternativos y de «química verde» para el control de hongos patógenos en las enfermedades de los cereales, tanto en la postcosecha como en el almacenamiento, nos llevó a ensayar

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

diferentes concentraciones de nanopartículas de plata contra 3000 esporas de hongos patógenos.

La tabla 2 muestra las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de AgNP biogénicas y AgNP-CH biogénicas contra algunos de los hongos patógenos más típicos de los cereales F. Oxysporum, *Botrytis cinerea*, A. versicolor y A. brasiliensis. AgNP biogénicas mostraron valores de CMI desde 104,7 µg/mL hasta 227,4 µg/mL con una actividad máxima contra A. Brasiliensis, y mínima contra *Botrytis cinerea*. Por otro lado, AgNP-CH aumentan la actividad antifúngica contra F. oxysporum mostrando la mayor actividad con 41,7 µg/mL, mientras que, con el resto de hongos patógenos ensayados, se obtuvieron CIMs similares, de 208,3 µg/mL. La mejora de la actividad antifúngica de las AgNPs biogénicas mediante el recubrimiento de quitosano, podría deberse al aumento de la carga superficial positiva de las nanopartículas, que podría permitir una mejor penetración en la célula fúngica debido a la carga negativa de sus membranas (Xue et al., 2019) (Fan et al., 2018). Ambas nanopartículas biogénicas muestran una alta actividad antifúngica con bajas concentraciones de tratamientos. El efecto antifúngico de las nanopartículas de plata se ha demostrado en muy pocos estudios (Gupta et al., 2018). A pesar de esto, otros trabajos han mostrado el alto efecto antifúngico de las nanopartículas de plata a bajas dosis (Zhao et al., 2021). Sin embargo, la evaluación de otras nanopartículas como agentes antifúngicos ha sido más ampliamente evaluada. Las nanopartículas mixtas de oro y quitosano y las nanopartículas de carbono se probaron contra diferentes cepas de *F. oxysporum*, mostrando la máxima actividad inhibitoria a 5 mL de 75 µg/mL (Lipsa et al., 2020). El quitosano y sus nanopartículas con biomoléculas encapsuladas han sido ampliamente ensayados como agente antifúngico, mostrando efectos inhibitorios en diferentes hongos como *F. oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Botrytis cinerea* Pers., *A. niger*, *A. flavus* entre otros (Ren et al., 2021) (Salgado-Cruz et al., 2021; Hasheminejad et al., 2019 y (Modéjar-López et al., 2022).

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de Control (Tebuconazol), AgNP biogénicas y AgNP-CH biogénicas en µg/mL

Tratamiento de germinación de esporas (mg/mL)			
Hongo (3000 spores)	**Control (Tebuconazol) (µg/mL)**	**AgNP-biogénicas (µg/mL)**	**AgNP-CH biogénicas (µg/mL)**
F.oxysporum	500	227,4	41,7
A.niger	1000	291,7	208,3
A.versicolor	500	208,3	208,3
A. brasiliensis	1000	104,2	208,3

3.7 Propiedades antioxidantes de las nanopartículas de plata biogénica

Un ambiente desfavorable junto con la insuficiencia de recursos hídricos y de nutrientes en el suelo, como los suelos de secano o de regadío (con un alto contenido de sales), pueden limitar el crecimiento satisfactorio de las plantas, lo que conduce a una disminución del rendimiento de la producción y de la calidad final. En estas condiciones no deseadas, las plantas aumentan su contenido en especies reactivas de oxígeno (ROS) produciendo la oxidación de lípidos, proteínas y otros componentes celulares, lo que conducen a la pérdida funcional (Brauer et al., 2019). El correcto crecimiento y adaptación de las plantas depende principalmente de la capacidad de éstas para aumentar el ascorbato, el glutatión y otros compuestos antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo (Iqbal et al., 2021). La incorporación de diferentes tratamientos antioxidantes en la etapa temprana del crecimiento de la planta puede evitar el estrés oxidativo, conduciendo así a un correcto desarrollo de los cultivos. Para determinar las propiedades antioxidantes de las nanopartículas de plata biogénica con el fin de ampliar su utilidad, utilizamos el método de barrido de DPPH. Los resultados mostrados en la Fig. 1 D) confirman las propiedades antioxidantes de las nanopartículas de plata biogénica al eliminar un máximo del 65% y 59% del DPPH para la AgNP biogénica y la AgNP-CH biogénica respectivamente a 1500 µg/mL. A dosis más bajas, de 90 µg/mL a 320 µg/mL, la actividad de eliminación de DPPH en el caso de AgNP-CH fue mayor que la de las nanopartículas sin recubrimiento. Sin embargo, a las dosis máximas las AgNP mostraron mayores propiedades

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

antioxidantes, probablemente porque las recubiertas evitan la interacción de diferentes compuestos antioxidantes recubiertos, como los polifenoles y los flavonoides, para interactuar con el DPPH.

3.8 Nanopartículas de plata recubiertas de quitosano como agente seguro de recubrimiento de semillas

El uso de nanopartículas de plata sigue estando en el punto de mira en el control de cultivos, debido a sus posibles efectos fitotóxicos en diferentes plantas de cultivo (Dimkpa et al., 2013). Sin embargo, los usos de las nanopartículas de plata procedentes de recursos verdes, surgen como una alternativa de seguridad. La fitotoxicidad y los efectos en el crecimiento de las plantas de los tratamientos se evaluaron midiendo la longitud del tallo, la raíz, así como el peso total del brote después de la germinación en comparación con las muestras no tratadas y el tratamiento con tebuconazol utilizado como tratamiento estándar de referencia. En todos los casos, los porcentajes de germinación fueron superiores al 85%. Como se muestra en la Figura 4 A, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control en la longitud de las raíces. Sin embargo, los datos correspondientes a la longitud del tallo y al peso total mostraron una ligera tendencia al aumento de la longitud del tallo en los tres tratamientos evaluados, así como del peso total de los brotes, excepto en el tratamiento de nanopartículas de plata recubiertas de quitosano, que no mostró diferencias significativas con el control no tratado (Figura 4 B y C). Aunque estos ligeros aumentos son difíciles de interpretar, parecen indicar que no existe un efecto fitotóxico observable del tratamiento a nivel macroscópico ni un efecto sobre la producción global de biomasa durante la germinación a dosis antifúngicas. Otros estudios en los que se utilizaron nanopartículas de plata biogénica procedentes del extracto del fruto de Phyllanthus emblica L. con aplicación foliar en plantas de trigo, en los que se comprobó la actividad antiozonante de estas nanopartículas, mostraron un efecto eficaz y no fitotóxico en las plantas tratadas (Kannaujia et al., 2022).

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

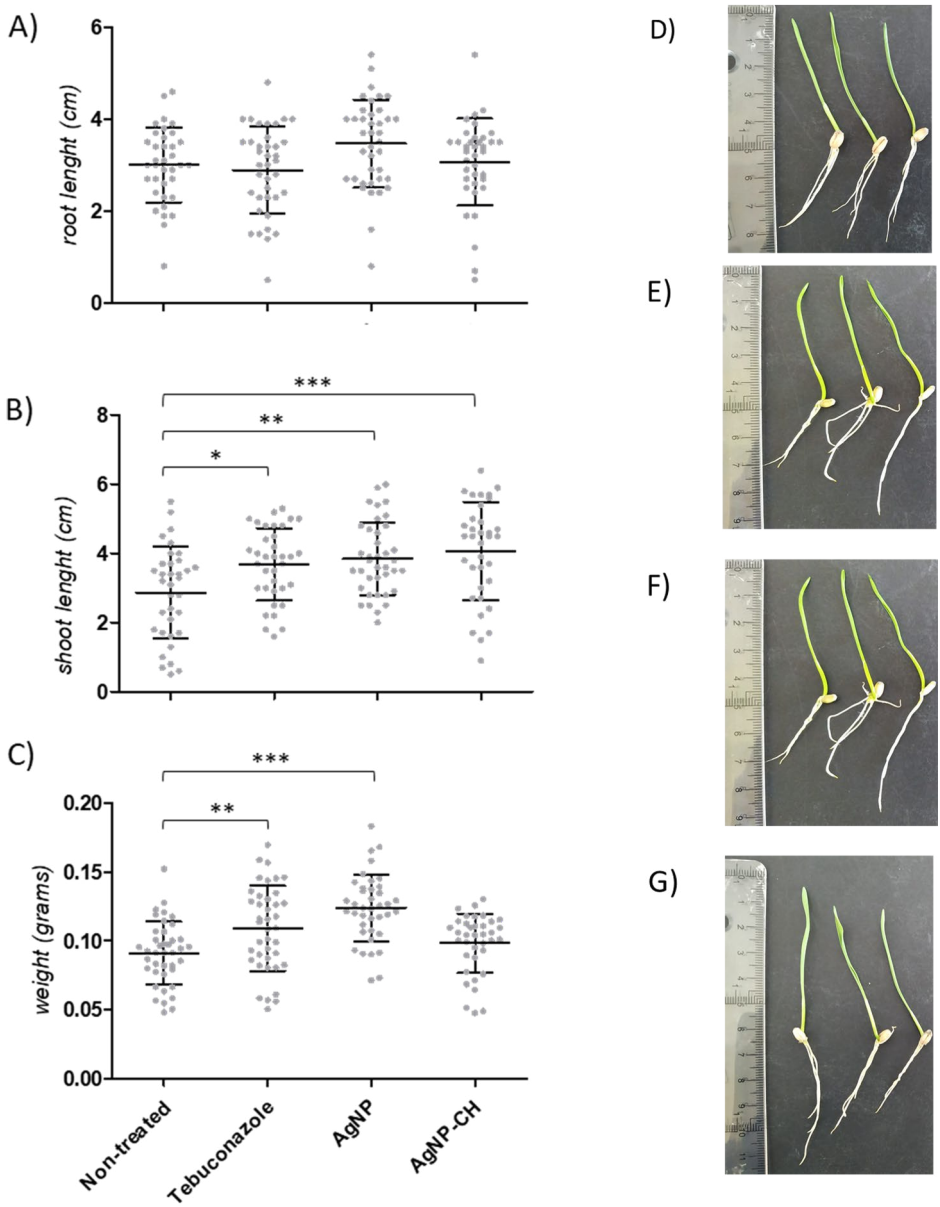


Figura 4. Evaluación del efecto de los diferentes tratamientos sobre la germinación de las semillas de trigo. D) control, E) tebuconazol, F) AgNP y G) AgNP-CH. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc de comparación múltiple de Dunnett. La significación estadística se muestra por encima de las barras (*, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01; ***, P ≤ 0,001).

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

3.9 Determinación del contenido de clorofila de las plantas tratadas

Para investigar el posible efecto fitotóxico de las nanopartículas de plata recubiertas de quitosano a nivel fisiológico, realizamos una evaluación del contenido de clorofila, ya que estudios anteriores han sugerido que las nanopartículas de plata podrían tener un impacto negativo en el aparato fotosintético a través de la reducción de las clorofilas totales (Tripathi et al., 2017). La evaluación de la concentración de clorofila A, B y clorofila total por peso seco, enumerada en la Tabla 3, mostró un ligero aumento en la concentración de clorofila total con las semillas tratadas con AgNP-CH en comparación con los otros tratamientos a las dosis probadas. Este aumento puede deberse a la presencia de quitosano en las nanopartículas recubiertas, como se ha demostrado en otros estudios (Balusamy et al., 2022). Los datos sugieren un escaso impacto a nivel fisiológico, al menos desde el punto de vista de la producción de clorofila. Las nanopartículas de óxido de manganeso se han probado como agente de cebado de semillas en sandía y los resultados del contenido de clorofila mostraron un aumento dependiente de la dosis y de la especie (Kasote et al., 2021).

Tabla 3. Determinación del contenido de clorofila en las plantas tratadas

Tratamiento	Clorofila A (µg/mL)	Clorofila B (µg/mL)	Clorofila total (µg/g)
Tebuconazol	22.11±0.04	32.11±8.6	4.3±0.94
AgNP	20.84±0.66	29.91±10.74	4.55±1.65
AgNP-CH	23.21±1.37	39.34±7.65	5.44±1.94
No tratadas	20.58±0.6	28.61±12.2	4.81±1.28

4. Conclusiones

En conclusión, por primera vez se obtuvieron nanopartículas biogénicas de plata a partir de residuos de hojas de trigo generados en la provincia de Albacete. Las nanopartículas biogénicas se recubrieron por el conocido polisacárido elicitor quitosano. La incorporación del quitosano mostró una menor agregación que las nanopartículas no recubiertas, con forma esférica y un tamaño que oscila entre 2-10 nm. El recubrimiento de

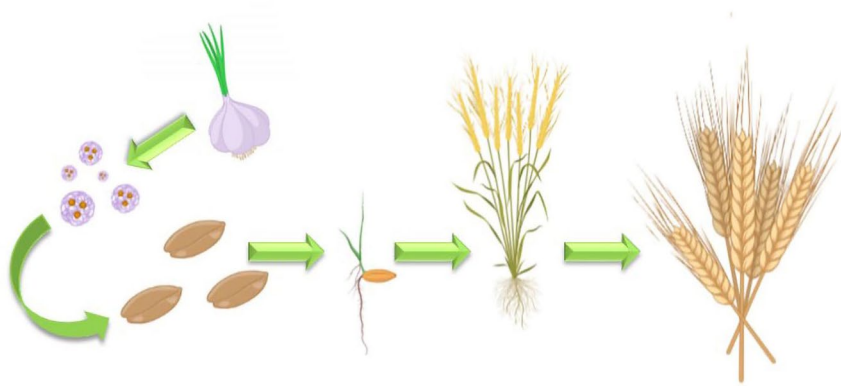
Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

quitosano mejoró la actividad antifúngica contra los hongos patógenos de los cereales. Por lo tanto, estas nanopartículas pueden utilizarse como una alternativa potencial a los peligrosos agentes antifúngicos actuales, para prevenir las infecciones fúngicas en los cereales en las primeras etapas. Finalmente, el uso de estas nuevas nanopartículas obtenidas muestra un incremento en la producción de clorofila, no muestra actividad fitotóxica contra las semillas de trigo tratadas y no compromete el crecimiento de las plantas al menos en las dosis ensayadas.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COMO AGENTE DE RECUBRIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE AJO ENCAPSULADO EN NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO EN UN CICLO COMPLETO EN CULTIVOS DE TRIGO, AVENA Y CEBADA



Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

1. Introducción

La emergencia climática, el aumento de resistencias en especies fúngicas, la población creciente y las toxicidades generadas en animales y humanos por el consumo indirecto de los tratamientos convencionales como los triazoles demanda la obtención y aplicación urgente de nuevas alternativas.

Como se ha visto en los trabajos anteriores se han desarrollado dos posibles alternativas con alta eficiencia en la protección de semillas, tanto en prevención fúngica como en preservación del desarrollo vegetativo. Sin embargo, de los dos tratamientos propuestos las GEO-NPCH han mostrado en los estadíos iniciales de desarrollo de las plantas un mayor efecto elicitor y vigorizante. Además, cabe destacar que debido a que los precursores de estas nanopartículas consisten en dos materias primas ya aprobadas para su uso en agricultura esto supondría una mayor facilidad para su traslación a los cultivos del mundo. Por todo ello, como todo producto potencial, debe someterse a condiciones de cultivo habituales en ciclos vegetativos completos para evaluar su comportamiento más cercano a la realidad.

Por otro lado, el escalado es un paso crucial por el que cualquier producto o tratamiento potencial debe de atravesar para que pueda llevarse al campo. En este caso, existen diversos mecanismos e instrumentaciones ya a disposición de la industria para llevar a cabo procesos de encapsulación en nanopartículas a través de técnicas similares, como ya se ha observado en distintos campos como el de la medicina y la cosmética (He et al., 2017) (Alves et al., 2021).

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Con esta premisa, y con el fin de realizar una evaluación más próxima a la realidad de la efectividad de las GEO-NPCH como tratamiento alternativo al Tebuconazol como protector de las semillas ante infecciones fúngicas y como tratamiento vigorizante, se ha procedido a evaluar el tratamiento con GEO-NPCH en tres tipos de cereales (Trigo duro, Avena y Cebada) en un cultivo de experimentación en secano en la provincia de Albacete y se ha realizado la evaluación de los tratamientos durante el periodo habitual de actividad de los tratamientos preemergencia, desde el inicio de siembra hasta el fin de la etapa de desarrollo vegetativo de dichos cereales.

2. Materiales y métodos

El quitosano de bajo peso molecular (CH) (50-190 kDa) con un grado de desacetilación del 75-85 %, el tripolifosfato (TPP), el bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT), el tebuconazol (TB) y todos los disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El Orius 20 EW (20% de Tebuconazol) de Nufarm España y el GEO fue extraído de diversos destríos de la provincia de Albacete. Los organismos utilizados para los ensayos antifúngicos consistieron en especies de *Aspergillus versicolor, A. niger* y *Fusarium oxysporum*, que se aislaron del suelo y se examinaron visual y microscópicamente para la caracterización morfológica de los aislados, como se describió previamente en (Palmero et al., 2014) y se confirmó su identidad utilizando cebadores ITS como se describe en (Gardes et al., 1993).

2.2 Preparación de nanopartículas de ajo-quitosano

La encapsulación de la GEO en nanopartículas de quitosano (GEO-NPCH) se formuló en un proceso de dos pasos: en primer lugar, se llevó a cabo una emulsión oleo-acuosa (o/w), seguida del método de gelificación iónica descrito anteriormente. Brevemente, se mezclaron 5 L de solución de CH previamente preparada en una disolución de Tween 80 al 1% y se agito a 1000 RPM a una temperatura de 50ºC. Posteriormente, se

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

añadieron gota a gota diferentes cantidades de GEO para formar cuatro propuestas de CH:GEO a un ratio 1:0,75 p/p bajo agitación continua y se emulsionó a 1000 RPM durante 10 min a temperatura ambiente. Por último, se añadió gota a gota una disolución acuosa de TPP al 0,2% a un caudal de 2 mL/min bajo agitación continua para inducir la gelificación iónica. Después, se agitó a 700 RPM durante 40 min. Las nanopartículas se recogieron después de centrifugarlas a 15.000 RPM durante 20 min a 4ºC y, posteriormente, se lavaron varias veces con agua mQ. La suspensión de nanopartículas se congeló a -80ºC y se liofilizó durante 48h a -50ºC (LyoQuest-85 / 208V 60 Hz, Teslar).

2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación y de la eficiencia de carga de las nanopartículas de aceite esencial de ajo-Quitosano (GEO-NPCH)

Se mezcló una suspensión de la muestra (100 µL) con 5 mL de HCL 2M y se hirvió a 95 ºC en reflujo. Después de enfriar, se añadió 1 mL de Etanol absoluto a la mezcla homogénea antes de centrifugar a 9.000 rpm durante 1 min a 25ºC. El sobrenadante se analizó por espectrofotometría UV-vis en un rango de longitudes de onda de 250-400 nm para cubrir la longitud de onda máxima de absorción del aceite esencial de ajo (325nm) (Ang et al., 2009). También se prepararon nanopartículas de quitosano sin GEO (NPCH) como control sin sustancia activa de la misma manera.

La capacidad de carga (LC) y la eficiencia de encapsulación (EE) del GEO se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

LC % = (peso de la GEO encapsulada (mg)) / (peso del total (GEO encapsulada + peso del material) (mg)) × 100%
EE % = (peso de GEO encapsulado (mg)) / (peso inicial de GEO (mg)) × 100%

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

2.4 Evaluación de las nanopartículas de GEO-Quitosano como agente de recubrimiento de semillas

Para evaluar los efectos morfológicos en las plantas, se trataron lotes de 3kg de semillas de trigo, 3 Kg de cebada y 3 Kg de avena mediante pulverizador con GEO-NPCH a una concentración de 10 mg/mL basándonos en los efectos evaluados en estudios anteriores. El efecto se comparó con la concentración recomendada por el fabricante de la formulación de TB (45 mg/mL de producto con 9 mg/mL de TB pura) y con las mismas semillas tratadas con TB comercial utilizando nuestro sistema de recubrimiento (pulverizador) con el fin de evaluar las deficiencias del sistema de recubrimiento respecto a las semillas recubierta por una empresa local smillista (Cereales Candelo SL.). Tambíen se utilizaron semillas sin tratar para hacer un estudio multicomparativo. Las semillas se cultivaron en Albacete (España) en las coordenadas 39°07'06.2 "N 1°30'40.8 "W en una parcela de experimentación de 27000 m^2. Se dividieron en microparcelas de 3000 m^2 por cada tratamiento según lo mostrado en la figura 1 del presente capitulo. Se recogieron muestras de las plantas tras 30 y 90 días de tratamiento. Las plantas se evaluaron midiendo el peso, la longitud de las raíces, la longitud de las hojas en cm y demás parámetros morfológicos. Se recogieron unas 20 plantas de las cuales se escogieron 6 de manera homogénea basándose en la morfología más representativa de población muestral para la evaluación.

2.5 Contenido de flavonoides, polifenoles y clorofilas en las plantas tratadas

Con el fin de evaluar si los distintos tratamientos producen alteraciones en el comportamiento celular y en las plantas, se procedió a medir los niveles de polifenoles, flavonoides y clorofilas.

2.5.1 Determinación de los polifenoles totales

Para determinar la cantidad total de polifenoles en el extracto acuoso, se llevó a cabo el método de Folin-Ciocalteau (Lin & Tang,

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

2007). Brevemente, se mezclaron 0,1 mL de extracto acuoso con 2 mL de Na2CO3 al 2%, 2,8 mL de H2O y 0,1 mL de reactivo Folin-Ciocalteau. Tras la mezcla, se midió el cambio de color mediante la absorbancia a 750 nm. Se utilizó el ácido gálico (GAE) como estándar a diferentes concentraciones (10-200 ppm). El experimento se llevó a cabo en n=3.

2.5.2 Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides en el extracto acuoso se determinó mediante un método colorimétrico con el uso de AlCl3*6H2O (Lin & Tang, 2007). Brevemente, se mezclaron 0,5 mL de extracto acuoso con 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de $AlCl_3$*$6H_2O$ al 10%, 0,1 mL de CH_3COOK 1 M y 2,8 mL de H_2O. Después de mezclar, se evaluó el cambio de color a 415 nm. Se utilizó quercetina (QE) como estándar a diferentes concentraciones (8-500 ppm). El experimento se realizó por triplicado.

2.5.3 Determinación del contenido de clorofila en las plantas tratadas

El contenido total de clorofila en las hojas de las plantas de las semillas tratadas se evaluó como (Asimovic et al., 2016) (con algunas modificaciones). Concretamente, se extrajeron 50 mg de hojas en polvo con 300 µL de acetona al 80%. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 10 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 662 y 644 nm. Los análisis estadísticos de los datos significativos se evaluaron mediante ANOVA de una vía y pruebas post hoc de Bonferroni.

2.7 Estadísticas

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet con el software estadístico GraphPad Prism versión 5.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. Las diferencias se comprobaron a < 0,05 (nivel de probabilidad del 95%).

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

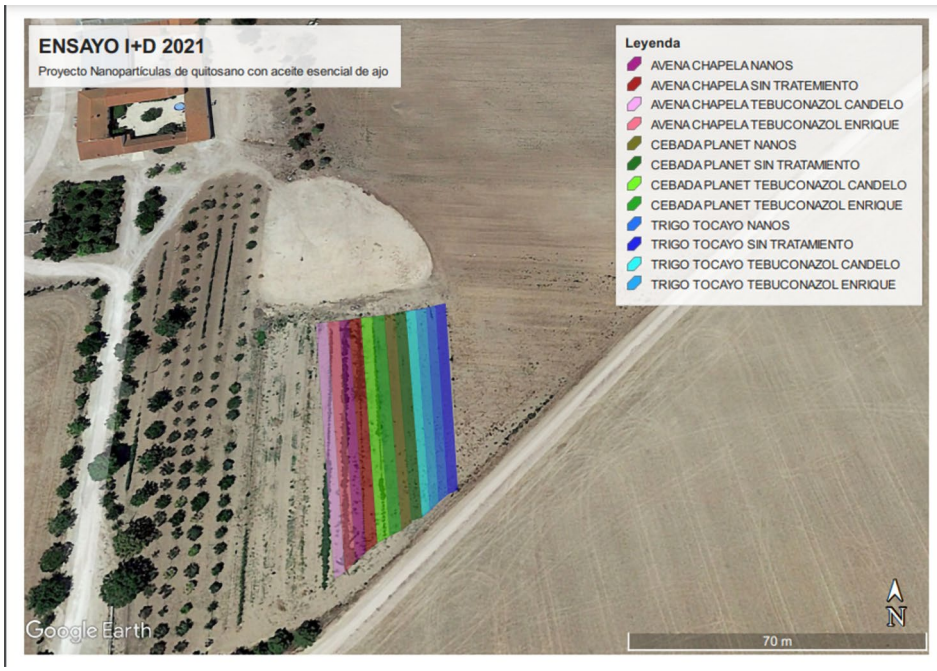


Figura 1. Patrón de difracción de rayos X de nanopartículas de quitosano, GEO-nanopartículas de quitosano y quitosano en polvo (XDR)

3 Resultados y discusión

3.1 Evaluación del tratamiento de semillas con GEO-NPCH en trigo de secano

3.1.1 Evaluación morfológica

Las imágenes captadas y mostradas en la fig. 2 muestras las diferencias obtenidas con todos los tratamientos testeados después de 30 y 90 días tras la siembra. A nivel morfologógico mediante examinación visual se observó como desde los 30 días las plantas tratadas con las GEO-NPCH presentaron un mayor enraizamiento y mayores longitudes en las raíces.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

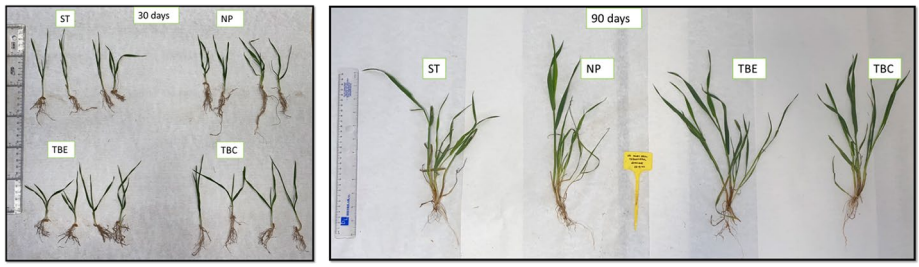


Figura 2. Análisis morfológico de los distintos tratamientos en Trigo. A la izquierda muestras obtenidas a los 30 días de siembra a la derecha muestras obtenidas a los 90 días de siembra. ST (sin tratamiento; NP (tratada con GEO-NPCH; TBE (tratadas mediante pulverizador conTB); TBC (semillas tratadas por el semillista)

Dichos resultados quedan reflejados en el estudio estadístico realizado mediante el test de comparación multiple de Dunn (figura 3) para establecer diferencias significativas tras los tratamientos. En dichos resultados se ve un incremento en la longitud de las raíces en las semillas tratadas con GEO-NPCH. Sin embargo, los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas respecto al resto de tratamientos.

Sin embargo, a los 90 días las diferencias se incrementan de manera significativa como se puede observar en la imagen derecha de la figura 2 donde las semillas tratadas con las nanopartículas mostraron una mayor longitud de raíz, de hoja y un mayor ahijamiento. Dichos datos se pueden observar en la figura 4 donde se confirma que la diferencia adquiere un comportamiento significativo donde los parámetros de longitud de raíces, número de ahijamiento, peso total y peso de raíz es significativamente superior en las plantas tratadas respecto al TB y respecto a las plantas sin tratar. Durante las primeras fases de desarrollo el vigor en las plantas tratadas con el nuevo tratamiento queda evidente debido a que durante estas fases las plantas requieren de mayores recursos para superar diversas situaciones de estrés biótico y abiótico (Wasternack, 2014) (Balachandran et al., 1997)

Por último, se evaluó si los tratamientos producían alguna alteración de la actividad celular de las plantas a modo de evaluación de seguridad mediante la medición de diversos metabolitos secundarios de

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

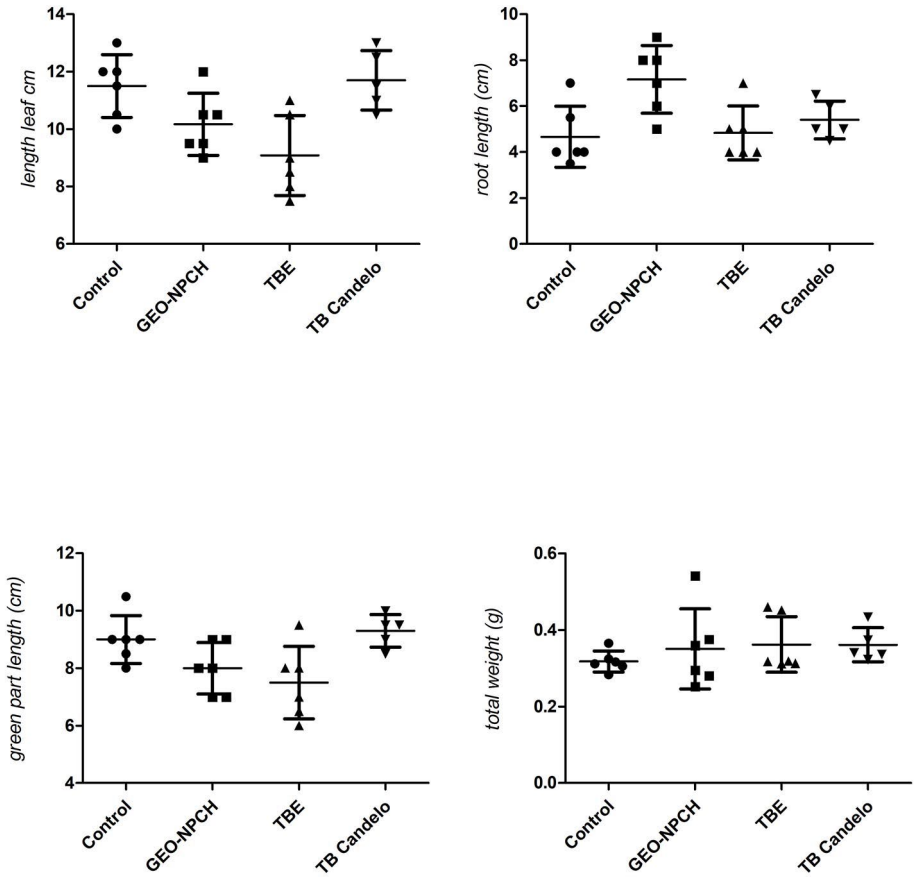


Figura 3. Análisis gravimitrico y longitudinal a los 30 días de siembra de las plantas de trigo tratadas. Control (plantas sin tartar; GEO-NPCH (plantas de semillas tratadas con GEO-NPCH); TBE (Plantas de semillas tratadas mediante pulverizador con TB); TB Candelo (Plantas de las semillas provistas por la empresa semillista)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

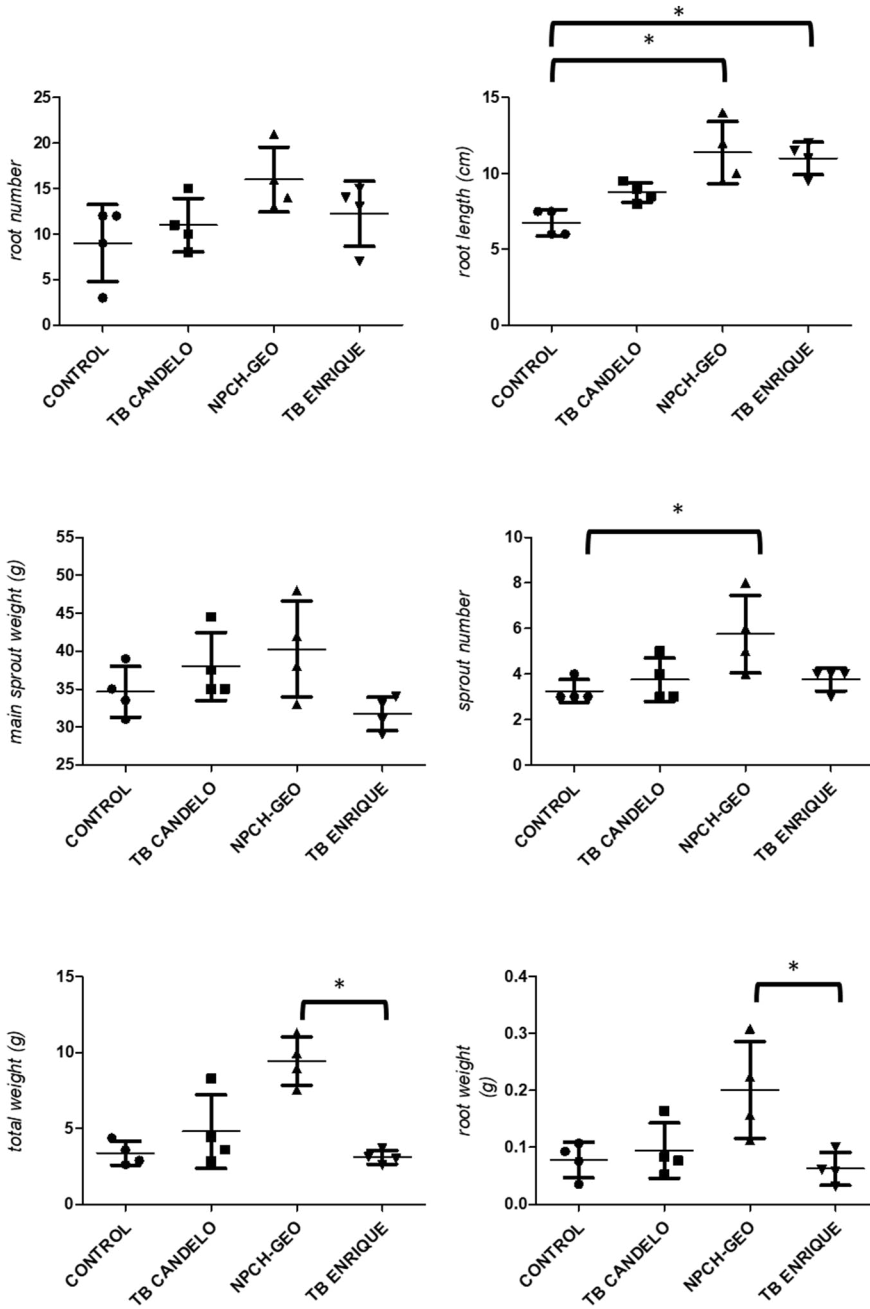


Figura 4. Análisis gravimitrico y longitudinal a los 30 días de siembra de las plantas de trigo tratadas. Control (plantas sin tartar; GEO-NPCH (plantas de semillas tratadas con GEO-NPCH); TBE (Plantas de semillas tratadas mediante pulverizador con TB); TB Candelo (Plantas de las semillas provistas por la empresa semillista)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

la planta (polifenoles, flavonoides y clorofila) como se ha descrito en los capítulos anteriores (Mondéjar-López et al., 2021).

Tabla 1. Ccontenido de Clorofila total, polofenoles y flavonoides totales de las muestras de trigo recogidas a los 90 días de cultivo

	MEDIDAS 90 DÍAS		
Muestra	**Clorofila total mg/g**	**Polifenoles totales mg/g**	**Flavonoides totales mg/g**
SIN TRATAR	8,54	11,63	13,15
TOCAYO NP	8,24	8,66	11,88
TOCAYO TBE	8,25	10,41	12,89
TOCAYO TBC	8,46	9,38	12,49

Los resultados mostrados en la tabla 1 reflejan los contenidos totales de clorofilas, de polifenoles y de flavonoides extraídos de las hojas recogidas a los 90 días. En la primera columna se observan los valores obtenidos de clorofilas donde no se aprecian diferencias entre los distintos tratamientos. Los valores obtenidos en el contenido de polifenoles totales muestran unos niveles inferiores en los tratamientos respecto el control y la misma tendencia es observada en el contenido de flavonoides. Sin embargo, las diferencias no muestran una alteración significativa mantenido valores típicos reportados de manera habitual en este estadio de desarrollo vegetativo indicando que ninguno de los tratamientos producía ningún efecto fitotóxico ni alteración indeseada en el periodo evaluado (Heimler et al., 2010) (Balusamy et al., 2022).

3.2 Evaluación del tratamiento de semillas con GEO-NPCH en cebada

3.2.1 Evaluación morfológica

A diferencia de lo ocurrido a las muestras de trigo, a los 30 días desde del inicio del cultivo, en cebada el tratamiento con GEO-NPCH produjo un incremento en el desarrollo de la parte aérea de la planta tal y como se puede observar en la Figura 5, donse se observan unas hojas con mayor grosor y longitud. En esta imagen se puede apreciar una mayor aparición de raíces aunque visualmente no se ven diferencias tan

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Figura 5. Análisis morfológico de los distintos tratamientos en Cebada. A la izquierda muestras obtenidas a los 30 días de siembra a la derecha muestras obtenidas a los 90 días de siembra. ST (sin tratamiento; NP (tratada con GEO-NPCH; TBE (tratadas mediante pulverizador conTB); TBC (semillas tratadas por el semillista)

pronunciadas en la longitud respecto al resto de tratamientos como las ocurridas en el trigo.

En la figura 6 se puede observar como a los 30 días de cultivo la longitud de la parte aérea y el peso total de las plantas tratadas con GEO-NPCH fueron superiores. Sin embargo, como muestra el análisis estadístico donde se encontraron más diferencias significativas fue en el desarrollo de la parte verde de la hoja donde se observó una mayor longitud en el caso de las plantas tratadas con las nanopartículas.

A pesar de observarse un mayor incremento en el crecimiento de las hojas, a los 90 días, como se observa en la figura 5, en el caso de las plantas tratadas con las nanopartículas ecológicas se observó un mayor incremento en la longitud de las raíces, así como un mayor número de las mismas y una consistencia más robusta. Además, como ya se observó en el caso del trigo, se produjo un incremento del ahijamiento exponencial y una mayor longitud de la parte aérea.

En la figura 7 los datos evaluados mediante el test de comparación múltiple de Dunn demostraron las tendencias observadas en las plantas de cebada tratadas con el tratamiento de GEO-NPCH donde se observó un incremento significativo en el peso total de las plantas y en el peso de las raíces respecto al tratamiento convencional tebuconazol asimilando la tendencia ya observada en trigo.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

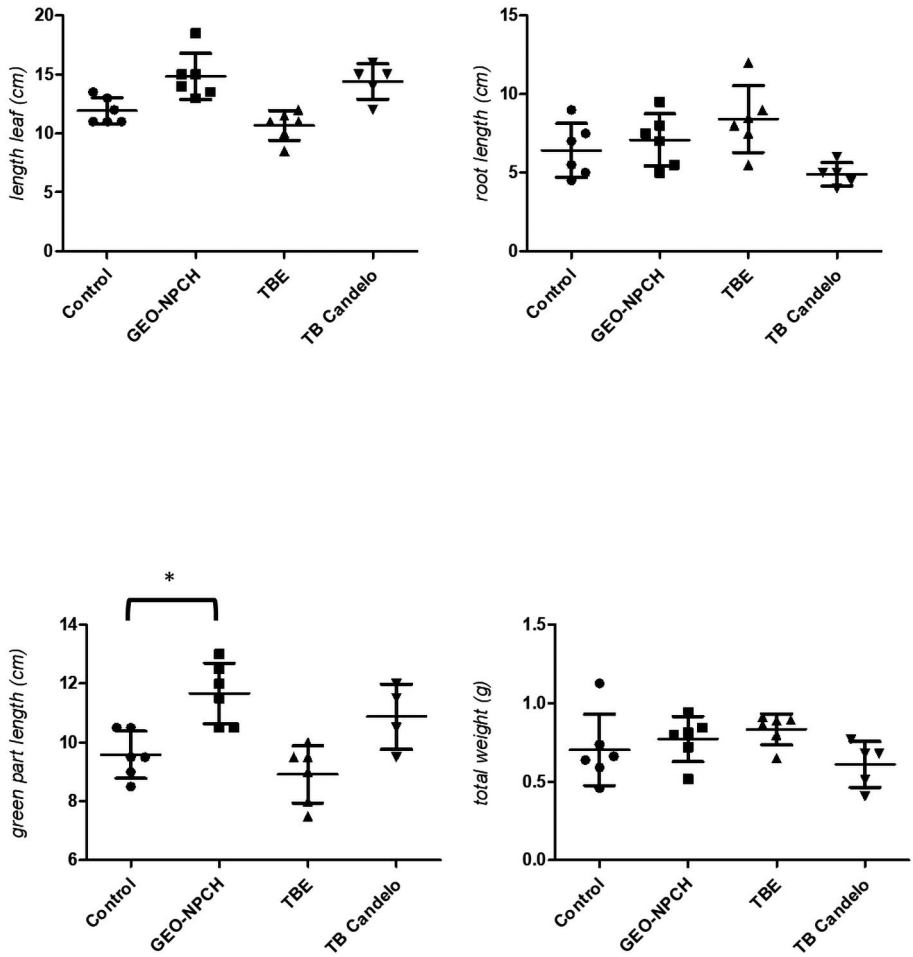


Figura 6. Análisis gravimitrico y longitudinal a los 30 días de siembra de las plantas de cebada tratadas. Control (plantas sin tartar; GEO-NPCH (plantas de semillas tratadas con GEO-NPCH); TBE (Plantas de semillas tratadas mediante pulverizador con TB); TB Candelo (Plantas de las semillas provistas por la empresa semillista)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

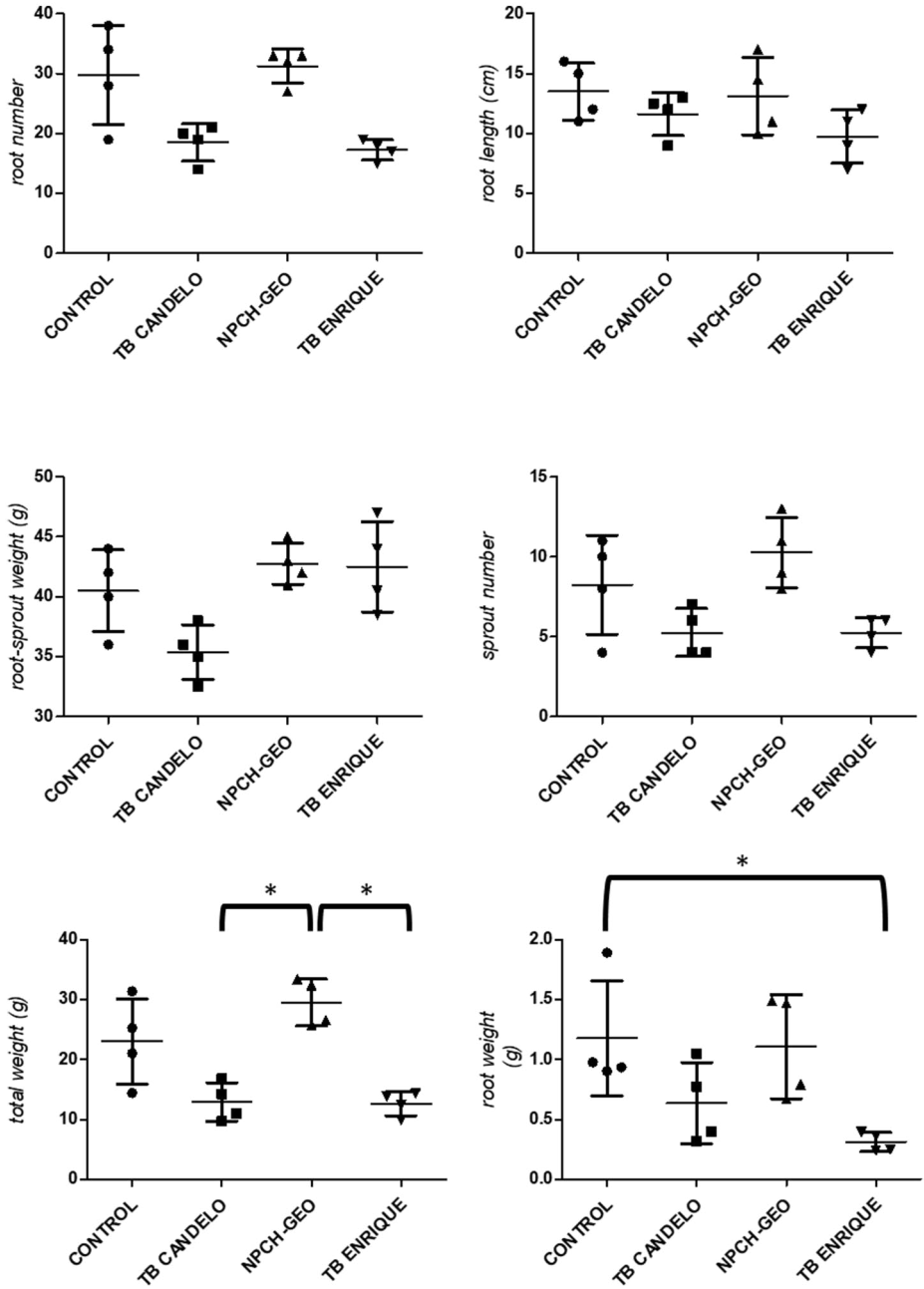


Figura 7. Análisis gravimitrico y longitudinal a los 90 días de siembra de las plantas de cebada tratadas. Control (plantas sin tartar; GEO-NPCH (plantas de semillas tratadas con GEO-NPCH); TBE (Plantas de semillas tratadas mediante pulverizador con TB); TB Candelo (Plantas de las semillas provistas por la empresa semillista)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Tabla 2. Contenido de Clorofila total, polofenoles y flavonoides totales de las muestras de cebada recogidas a los 90 días de cultivo

	MEDIDAS 90 DÍAS		
	Clorofila total mg/g	**Polifenoles totales mg/g**	**Flavonoides totales mg/g**
CEBADA S.T.	6,08	8,83	11,21
CEBADA NP	3,48	12,88	12,86
CEBADA TBE	3,66	11,04	15,16
CEBADA TBC	3,38	14,21	11,70

Con el fin de evaluar el perfil de seguridad del tratamiento en cebada se realizaron las mediciones de los metabolitos arriba citados para evaluar si el tratamiento influía en la actividad celular involucrada en estrés y crecimiento. Los resultados mostrados en la tabla 2 confirman la tendencia de bioseguridad observada en la otra especie de cereal, mostrando un comportamiento similar al resto de tratamientos y sin tratar, sin una tendencia clara del tratamiento utilizado.

3.3 Evaluación del tratamiento de semillas con GEO-NPCH en avena

3.3.1 Evaluación morfológica

El análisis morfológico y visual realizado en las muestras de avena recogidas a los 30 días ya muestran unas diferencias significativas respecto a los tratamientos y sin tratar. Como se observa en la figura 8, tanto las

Figura 8. Análisis morfológico de los distintos tratamientos en Cebada. A la izquierda muestras obtenidas a los 30 días de siembra a la derecha muestras obtenidas a los 90 días de siembra. ST (sin tratamiento; NP (tratada con GEO-NPCH; TBE (tratadas mediante pulverizador conTB); TBC (semillas tratadas por el semillista)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

raíces como las partes aéreas de las plantas tratadas con GEO-NPCH muestran un mayor tamaño, grosor y número en el caso de las raíces.

En la figura 6 se puede observar como a los 30 días de cultivo la longitud de la parte aérea y el peso total de las plantas tratadas con GEO-NPCH fueron superiores. Sin embargo, como muestra el análisis estadístico, donde se encontraron más diferencias significativas fue en el desarrollo de la parte verde de la hoja, donde se observó una mayor longitud en el caso de las plantas tratadas con las nanopartículas.

El desarrollo superior de las raíces y de la parte aérea de las plantas tratadas con las nanopartículas ecológicas queda patente en el test de comparación múltiple de Dunn realizado a las muestras obtenidas a los 30 días de desarrollo. En la figura 9 se observa un mayor crecimiento de las raíces y del peso total de las plantas tratadas con GEO-NPCH con unas diferencias significativas respecto al Tebuconazol y las plantas no tratadas

Como se ha observado en el resto de especies ensayadas a los 90 días las diferencias con el tratamiento de nanopartículas ecológicas respecto al resto de tratamientos se incrementaron de manera significativa. En el caso de las plantas de avena, tal y como se puede observar en la figura 8, esta tendencia se mantiene y se advierten unas diferencias muy significativas en la evaluación morfológica y visual donde se observó más crecimiento de la raíz, mayor número de las mismas, un ahijamiento más pronunciando con un mayor número de brotes confirmando el comportamiento vigorizante del nuevo tratamiento ecológico.

Para confirmar si las diferencias dimensionales y gravimétricas evaluadas durante el test visual realmente son significativas en datos tangibles se realizó, al igual que el resto de especies ensayadas, el test comparación múltiple de Dunn. Los datos observados en la figura 10, reflejaron lo visto en la figura 9 donde se observaron mayor longitud y número de raíces y un mayo peso de las plantas asociado principalmente a ese incremento de sistema radicular de la planta mostrando valores significativamente superiores respecto a las plantas sin tratar y las tratadas con el tratamiento convencional.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

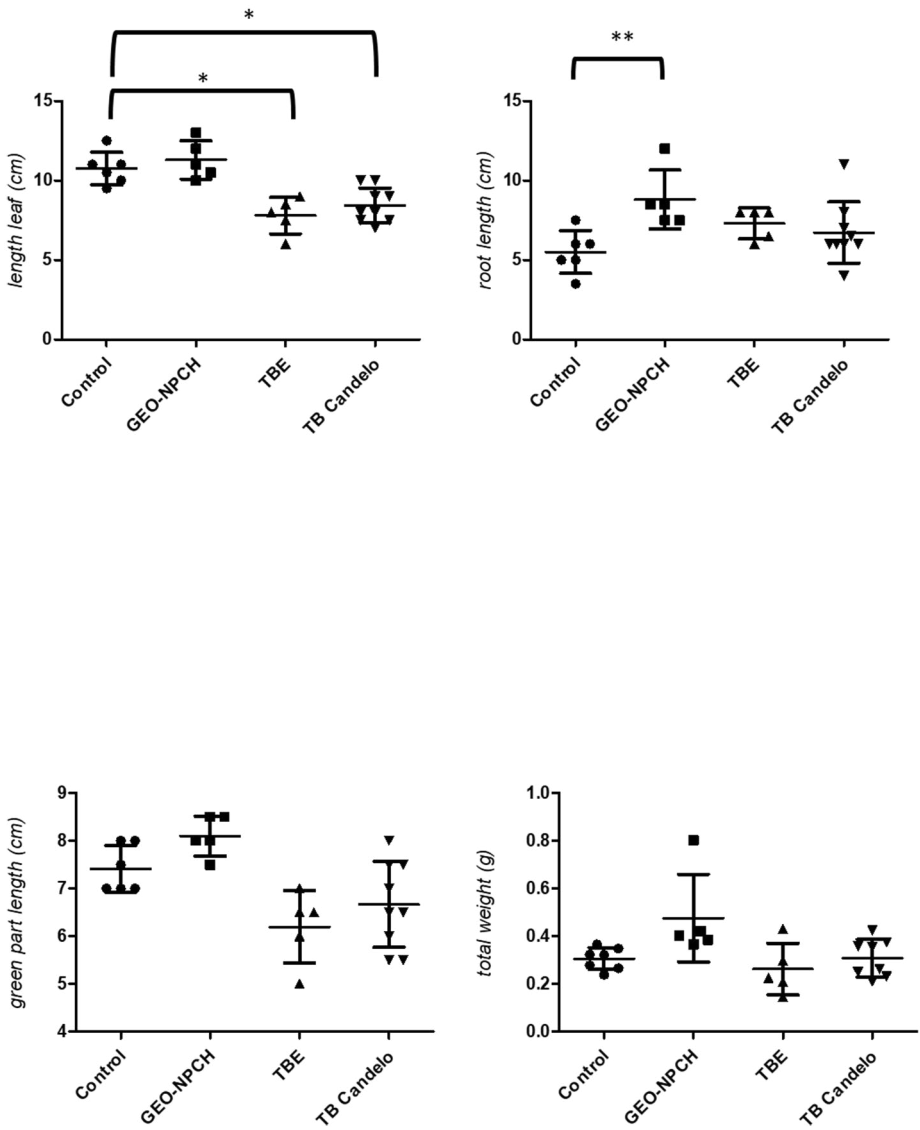


Figura 9. Análisis gravimitrico y longitudinal a los 30 días de siembra de las plantas de avena tratadas. Control (plantas sin tartar; GEO-NPCH (plantas de semillas tratadas con GEO-NPCH); TBE (Plantas de semillas tratadas mediante pulverizador con TB); TB Candelo (Plantas de las semillas provistas por la empresa semillista)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

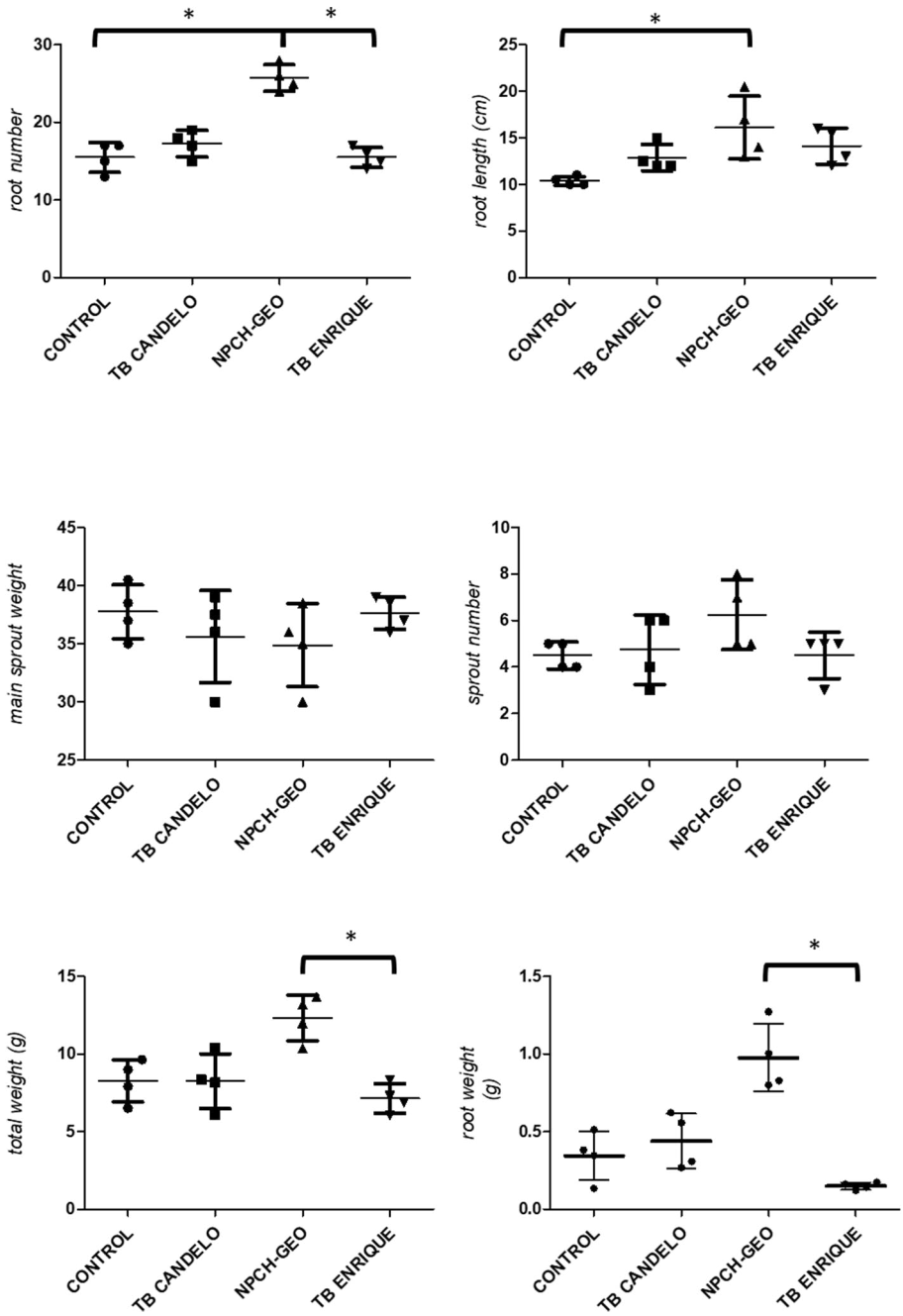


Figura 10. Análisis gravimitrico y longitudinal a los 90 días de siembra de las plantas de cebada tratadas. Control (plantas sin tartar; GEO-NPCH (plantas de semillas tratadas con GEO-NPCH); TBE (Plantas de semillas tratadas mediante pulverizador con TB); TB Candelo (Plantas de las semillas provistas por la empresa semillista)

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Tabla 3. Contenido de Clorofila total, polofenoles y flavonoides totales de las muestras de avena recogidas a los 90 días de cultivo

	MEDIDAS 90 DÍAS		
	Clorofila total mg/g	**Polifenoles totales mg/g**	**Flavonoides totales mg/g**
AVENA S.T.	3,01	2,07	8,57
AVENA NP	4,21	3,54	10,35
AVENA TBE	3,30	5,68	9,18
AVENA TBC	4,44	3,82	9,80

La tabla 3, de nuevo, refleja la misma tendencia de los ensayos anteriores en la cual no se mostraron signos de disrupción del funcionamiento fisiológico de las plantas tratadas con las nanopartículas respecto el resto de tratamiento mostrando valores similares confirmando ser un tratamiento seguro para esta planta.

4. Conclusiones finales

Tras este exhaustivo estudio focalizado en generar un nuevo tratamiento fitosanitario ecológico y vanguardista propuesto desde un enfoque de economía circular se puede confirmar que cumple los objetivos de funcionalidad y eficiencia protegiendo a la semilla durante los estadios de crecimiento vegetativo de los cultivos cereales además de promover la vigorosidad de las plantas mostrando resultados significativamente superiores a los 90 días de cultivo en el enraizamiento de las plantas así como el peso y el crecimiento vegetativo en algunas de las especies ensayadas, lo cual puede traducirse en un mayor rendimiento y unas mayores ganancias económicas. También se ha evaluado el perfil de seguridad de este nuevo tratamiento observando que no produce daño ni altera el desarrollo celular de manera nociva en las plantas tratadas. Con todo ello, se puede afirmar que desde la provincia de Albacete se han utilizado los residuos generados de uno de los productos más potenciales como es el ajo mediante economía circular, para realizar la técnica más novedosa en la protección de cultivos de cereales mediante nanotecnología verde con el fin de crear un nuevo tratamiento ecológico para semillas, respetuoso con el medio ambiente y la fauna que supondrá un gran avance

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

en la protección de cultivos, mayores ganancias económicas y una revolución del sector agrícola de la provincia. Además, debido a que una de las mayores demandas de la sociedad es la premisa de eliminar todos los compuestos de síntesis química del tratamiento y consumo de alimentos, este nuevo tratamiento ofrecerá una novedosa alternativa para satisfacer dichas necesidades de los consumidores y de los organismos regulatorios ya que con la inminente legislación europea se acogerán a este tipo de productos que permitan una cadena alimentaria segura, eficiente y respetuosa. Por lo tanto, se puede decir que Albacete ha tomado la iniciativa buscando ser referente mundial en la generación de nuevos tratamientos para la protección de cultivos mediante el aprovechamiento de sus recursos a través de nanotecnología verde y que posiblemente, en un futuro cercano, será un nuevo sector económico en la provincia.

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

BIBLIOGRAFÍA

ABBASI KHALAKI, M., MOAMERI, M., ASGARI LAJAYER, B. & ASTATKIE, T. (2021). Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. *Plant Growth Regulation*, *93*(1), 13–28. https://doi.org/10.1007/s10725-020-00670-9

AGRARIOS, M., GENERAL, D., MERCADOS, D. E. P. Y. & MAPA, A. (2019). *Dirección General de Producciones y EVOLUCIÓN DE LOS BALANCES DE CEREALES EN ESPAÑA Campañas 2017 / 2018 y 2018 / 2019*. 2017–2019.

ALVES, H. J., GASPARRINI, L. J., SILVA, F. E. B., CACIANO, L., DE MUNIZ, G. I. B., BALLESTER, E. L. C., CREMONEZ, P. A. & ARANTES, M. K. (2021). Alternative methods for the pilot-scale production and characterization of chitosan nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(9), 10977–10987. https://doi.org/10.1007/s11356-020-11343-5

ASHRA, B., RASHIDIPOUR, M., MARZBAN, A. & SOROUSH, S. (2019). Mentha piperita essential oils loaded in a chitosan nanogel with inhibitory e ff ect on bio fi lm formation against S. mutans on the dental surface. *Carbohydrate Polymers*, *212*(December 2018), 142–149. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.018

ASIMOVIC, Z., SARAJEVO, F. S., CENGIC, L. & MURTIC, S. (2016). Spectrophotometric determination of total chlorophyll content in fresh vegetables. *Works of the Faculty of Agriculture and Food Science, Unversity Sarajevo*, *66*(1), 104–107.

BALACHANDRAN, S., HURRY, V. M., KELLEY, S. E., OSMOND, C. B., ROBINSON, S. A., ROHOZINSKI, J., SEATON, G. G. R. & SIMS, D. A. (1997). Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, *100*(2), 203–213. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000201.x

BALUSAMY, S. R., RAHIMI, S., SUKWEENADHI, J., SUNDERRAJ, S., SHANMUGAM, R., THANGAVELU, L., MIJAKOVIC, I. & PERUMALSAMY, H. (2022). Chitosan, chitosan nanoparticles and modified chitosan biomaterials, a potential

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

tool to combat salinity stress in plants. *Carbohydrate Polymers*, *284*(October 2021), 119189. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119189

BEN-JABEUR, M., VICENTE, R., LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C., ALESAMI, N., DJÉBALI, N., GRACIA-ROMERO, A., SERRET, M. D., LÓPEZ-CARBONELL, M., ARAUS, J. L. & HAMADA, W. (2019). A novel aspect of essential oils: Coating seeds with thyme essential oil induces drought resistance in wheat. *Plants*, *8*(10). https://doi.org/10.3390/plants8100371

BENKEBLIA, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum). *LWT - Food Science and Technology*, *37*(2), 263–268. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.001

BITTELLI, M., FLURY, M., CAMPBELL, G. S. & NICHOLS, E. J. (2001). Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Metereology*, *107*, 167–175.

BLANKENSHIP, J. O., SMITH, D. R., BLANKENSHIP, J. & SMITH, D. R. (2014). Breaking Seed Dormancy in Parry's Clover by Acid Treatment. *Journal of Range Management*, *20*(1).

BRAUER, V. S., REZENDE, C. P., PESSONI, A. M., DE PAULA, R. G., RANGAPPA, K. S., NAYAKA, S. C., GUPTA, V. K. & ALMEIDA, F. (2019). Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules*, *9*(10), 1–21. https://doi.org/10.3390/biom9100521

BRUMMER, B., FELLE, H. & PARISH, R. W. (1984). Evidence that acid solutions induce plant cell elongation by acidifying the cytosol and stimulating the proton pump. *FEBS Letters*, *174*(2), 223–227. https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)81162-X

ÇAKIR, M. A., ICYER, N. C. & TORNUK, F. (2020). Optimization of production parameters for fabrication of thymol-loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *151*, 230–238. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.096

CASTILLO-HENRÍQUEZ, L., ALFARO-AGUILAR, K., UGALDE-ÁLVAREZ, J., VEGA-FERNÁNDEZ, L., DE OCA-VÁSQUEZ, G. M. & VEGA-BAUDRIT, J. R. (2020). Green synthesis of gold and silver nanoparticles from plant extracts and their possible applications as antimicrobial agents in the agricultural area. *Nanomaterials*, *10*(9), 1–24. https://doi.org/10.3390/nano10091763

CHAND, K., ABRO, M. I., AFTAB, U. & SHAH, H. (2019). activity against Staphylococcus aureus of silver nanoparticles using extracts of neem, onion and. *RSC Advances*, 17002–17015. https://doi.org/10.1039/c9ra01407a

CHUN, S. C. & CHANDRASEKARAN, M. (2019). Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

stress tolerance in tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, *125*, 948–954. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.167

D'AGOSTINO, M., TESSE, N., FRIPPIAT, J. P., MACHOUART, M. & DEBOURGOGNE, A. (2019). Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. *Molecules*, *24*(20). https://doi.org/10.3390/molecules24203713

DALENC, F., AMJAUD, Y., LAFFORGUE, C., DEROUN, F. & FESSI, H. (1997). Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules : formulation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, *153*, 127–130.

DANAEI, M., DEHGHANKHOLD, M., ATAEI, S., HASANZADEH DAVARANI, F., JAVANMARD, R., DOKHANI, A., KHORASANI, S. & MOZAFARI, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, *10*(2), 1–17. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057

DELAN, W. K., ZAKARIA, M., ELSAADANY, B., ELMESHAD, A. N., MAMDOUH, W. & FARES, A. R. (2020). Formulation of simvastatin chitosan nanoparticles for controlled delivery in bone regeneration: Optimization using Box-Behnken design, stability and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, *577*(September 2019), 119038. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119038

DELLA PELLE, F., SCROCCARELLO, A., SERGI, M., MASCINI, M., DEL CARLO, M. & COMPAGNONE, D. (2018). Simple and rapid silver nanoparticles based antioxidant capacity assays: Reactivity study for phenolic compounds. *Food Chemistry*, *256*(August 2017), 342–349. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.141

DIMKPA, C. O., MCLEAN, J. E., MARTINEAU, N., BRITT, D. W., HAVERKAMP, R. & ANDERSON, A. J. (2013). Silver nanoparticles disrupt wheat (Triticum aestivum L.) growth in a sand matrix. *Environmental Science and Technology*, *47*(2), 1082–1090. https://doi.org/10.1021/es302973y

DUDAI, N., BEN-AMI, M., CHAIMOVICH, R. & CHAIMOVITSH, D. (2004). Essential oils as allelopathic agents: Bioconversion of monoterpenes by germinating wheat seeds. *Acta Horticulturae*, *629*, 505–508. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.629.65

FAN, Q., YUAN, Y., JIA, H., ZENG, X., WANG, Z., HU, Z. & GAO, Z. (2021). Antimicrobial and anti-biofilm activity of thymoquinone against Shigella flexneri. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*, 4709–4718.

FERNÁNDEZ-VIZCAÍNO, E., ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E., FERNÁNDEZ-TIZÓN, M., MATEO, R., CAMARERO, P. R. & MOUGEOT, F. (2022). Bird exposure to fungicides through the consumption of treated seeds: A study of wild red-legged partridges in central Spain. *Environmental Pollution*, *292*(October 2021). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118335

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

FEYZIOGLU, G. C. & TORNUK, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (Satureja hortensis L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.037

FISHER, M. C., HENK, D. A., BRIGGS, C. J., BROWNSTEIN, J. S., MADOFF, L. C., MCCRAW, S. L. & GURR, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, *484*(7393), 186–194. https://doi.org/10.1038/nature10947

GADKARI, R. R., SUWALKA, S., YOGI, M. R., ALI, W., DAS, A. & ALAGIRUSAMY, R. (2019). Green synthesis of chitosan-cinnamaldehyde cross-linked nanoparticles: Characterization and antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, *226*(September), 115298. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115298

GARDES, M., BRUNS, T. D. & PATHOLOGY, P. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 113–118.

GEDAM, A. H. & DONGRE, R. S. (2015). Adsorption characterization of Pb(ii) ions onto iodate doped chitosan composite: equilibrium and kinetic studies. *RSC Advances*, *5*(67), 54188–54201. https://doi.org/10.1039/c5ra09899h

GUPTA, N., UPADHYAYA, C. P., SINGH, A., ABD-ELSALAM, K. A. & PRASAD, R. (2018). Applications of Silver Nanoparticles in Plant Protection. *Nanotechnology in the Life Sciences*, *December 2020*, 247–265. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91161-8_9

HADIDI, M., POURAMIN, S., ADINEPOUR, F., HAGHANI, S. & JAFARI, S. M. (2020). Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydrate Polymers*, *236*(February), 116075. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116075

HADRAMI, A. EL, ADAM, L. R., HADRAMI, I. EL & DAAYF, F. (2010). Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*, *8*, 968–987. https://doi.org/10.3390/md8040968

HAMABATA, A., GARCÍA-MAYA, M., ROMERO, T. & BERNAL-LUGO, I. (1988). Kinetics of the Acidification Capacity of Aleurone Layer and Its Effect upon Solubilization of Reserve Substances from Starchy Endosperm of Wheat. *Plant Physiology*, *86*(3), 643–644. https://doi.org/10.1104/pp.86.3.643

HASHEMINEJAD, N., KHODAIYAN, F. & SAFARI, M. (2019). Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*, *275*(April 2018), 113–122. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.085

HASSAN, M. M., XU, Y., ZAREEF, M., LI, H., RONG, Y. & CHEN, Q. (2021). Recent advances of nanomaterial-based optical sensor for the detection of benzimidazole

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

fungicides in food: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1980765

HE, Z., SANTOS, J. L., TIAN, H., HUANG, H., HU, Y., LIU, L., LEONG, K. W., CHEN, Y. & MAO, H. Q. (2017). Scalable fabrication of size-controlled chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin. *Biomaterials*, *130*, 28–41. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.028

HEIMLER, D., VIGNOLINI, P., ISOLANI, L., ARFAIOLI, P., GHISELLI, L. & ROMANI, A. (2010). Polyphenol content of modern and old varieties of triticum aestivum L. and T. durum Desf. grains in two years of production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(12), 7329–7334. https://doi.org/10.1021/jf1010534

HOSSEINI, S. F., ZANDI, M., REZAEI, M. & FARAHMANDGHAVI, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, *95*(1), 50–56. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031

HOSSEINNEJAD, M. & MAHDI, S. (2016). International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *85*, 467–475. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022

HU, Q. & LUO, Y. (2016). Polyphenol-chitosan conjugates : Synthesis, characterization, and applications. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 624–639. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.109

IQBAL, N., UMAR, S., KHAN, N. A. & CORPAS, F. J. (2021). Nitric oxide and hydrogen sulfide coordinately reduce glucose sensitivity and decrease oxidative stress via ascorbate-glutathione cycle in heat-stressed wheat (Triticum aestivum l.) plants. *Antioxidants*, *10*(1), 1–20. https://doi.org/10.3390/antiox10010108

JYOTI, K., BAUNTHIYAL, M. & SINGH, A. (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using Urtica dioica Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, *9*(3), 217–227. https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.002

KALAGATUR, N. K., GHOSH, O. S. N. & SUNDARARAJ, N. (2018). Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles Encapsulated With Cymbopogon martinii Essential Oil on Plant Pathogenic Fungi Fusarium graminearum. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(June), 1–13. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00610

KAMKAR, A., MOLAEE-AGHAEE, E., KHANJARI, A., AKHONDZADEH-BASTI, A., NOUDOOST, B., SHARIATIFAR, N., ALIZADEH, M. & SOLEIMANI, M. (2021). *International Journal of Food Microbiology Nanocomposite active packaging based on chitosan biopolymer loaded with nano-liposomal essential oil : Its*

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

characterizations and effects on microbial, and chemical properties of refrigerated chicken breast fille. *342*(January).

KANANONT, N., PICHYANGKURA, R., CHANPRAME, S. & CHADCHAWAN, S. (2010). Scientia Horticulturae Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two Dendrobium orchids (Asparagales : Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, *124*(2), 239–247. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.019

KANNAUJIA, R., SINGH, P., PRASAD, V. & PANDEY, V. (2022). Evaluating impacts of biogenic silver nanoparticles and ethylenediurea on wheat (Triticum aestivum L.) against ozone-induced damages. *Environmental Research*, *203*(May 2021), 111857. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111857

KASOTE, D. M., LEE, J. H. J., JAYAPRAKASHA, G. K. & PATIL, B. S. (2021). Manganese oxide nanoparticles as safer seed priming agent to improve chlorophyll and antioxidant profiles in watermelon seedlings. *Nanomaterials*, *11*(4). https://doi.org/10.3390/nano11041016

KEAWCHAOON, L. & YOKSAN, R. (2011). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *84*(1), 163–171. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031

KHODAEI, D., JAVANMARDI, F. & KHANEGHAH, A. M. (2021). The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: a three-year survey. *Current Opinion in Food Science*, *39*, 36–42. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.012

LIPSA, F. D., URSU, E. L., URSU, C., ULEA, E. & CAZACU, A. (2020). Evaluation of the antifungal activity of gold-chitosan and carbon nanoparticles on fusarium oxysporum. *Agronomy*, *10*(8), 1–11. https://doi.org/10.3390/agronomy10081143

LÓPEZ-ANTIA, A., ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E., MOUGEOT, F., CAMARERO, P. R. & MATEO, R. (2021). Birds feeding on tebuconazole treated seeds have reduced breeding output. *Environmental Pollution*, *271*, 116292. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116292

MAHAKHAM, W., SARMAH, A. K., MAENSIRI, S. & THEERAKULPISUT, P. (2017). Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–21. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5

MAHIZAN, N. A., YANG, S. K., MOO, C. L., SONG, A. A. L., CHONG, C. M., CHONG, C. W., ABUSHELAIBI, A., ERIN LIM, S. H. & LAI, K. S. (2019). Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules*, *24*(14), 1–21. https://doi.org/10.3390/molecules24142631

MATSHETSHE, K. I., PARANI, S., MANKI, S. M. & OLUWAFEMI, O. S. (2018). Preparation, characterization and in vitro release study of β-cyclodextrin/chitosan

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

nanoparticles loaded Cinnamomum zeylanicum essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 676–682. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.125

MONDÉJAR-LÓPEZ, M., LÓPEZ-JIMÉNEZ, A. J., ABAD-JORDÁ, M., RUBIO-MORAGA, A., AHRAZEM, O., GÓMEZ-GÓMEZ, L. & NIZA, E. (2021). Biogenic silver nanoparticles from iris tuberosa as potential preservative in cosmetic products. *Molecules*, *26*(15), 1–12. https://doi.org/10.3390/molecules26154696

MONDEJAR, M., RUBIO-MORAGA, Á., LÓPEZ-MARTÍNEZ, A. J., MARTÍNEZ, J. C. G., AHRAZEM, O., GÓMEZ-GÓMEZ, L. & NIZA, E. (2022). Chitosan nanoparticles loaded with garlic essential oil : A new alternative to tebuconazole as seed dressing agent. *Carbohydrate Polymers*, *277*. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118815

MUZZARELLI, R. A. A., MUZZARELLI, C., TARSI, R., MILIANI, M., GABBANELLI, F. & CARTOLARI, M. (2001). Fungistatic Activity of Modified Chitosans against Saprolegnia parasitica. *Biomacromolecules*, *2*, 165–169.

NAZZARO, F. (2017). *Essential Oils and Antifungal Activity*. 1–20. https://doi.org/10.3390/ph10040086

NIZA, E., BOŽIK, M., BRAVO, I., CLEMENTE-CASARES, P., LARA-SANCHEZ, A., JUAN, A., KLOUČEK, P. & ALONSO-MORENO, C. (2020). PEI-coated PLA nanoparticles to enhance the antimicrobial activity of carvacrol. *Food Chemistry*, *328*(February). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127131

PALMERO, D., RUBIO-MORAGA, A., GALVEZ-PATÓN, L., NOGUERAS, J., ABATO, C., GÓMEZ-GÓMEZ, L. & AHRAZEM, O. (2014). Pathogenicity and genetic diversity of Fusarium oxysporum isolates from corms of Crocus sativus. *Industrial Crops & Products*, *61*, 186–192. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.051

PRAKASH, P., GNANAPRAKASAM, P., EMMANUEL, R., AROKIYARAJ, S. & SARAVANAN, M. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of Mimusops elengi, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *108*, 255–259. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.03.017

RABEA, E. I., STEVENS, C. V, SMAGGHE, G. & STEURBAUT, W. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, *4*(6), 1457–1465.

RENTZSCH, S., PODZIMSKA, D., VOEGELE, A., IMBECK, M., MÜLLER, K., LINKIES, A. & LEUBNER-METZGER, G. (2012). Dose- and tissue-specific interaction of monoterpenes with the gibberellin-mediated release of potato tuber bud dormancy, sprout growth and induction of α-amylases and β-amylases. *Planta*, *235*(1), 137–151. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1501-1

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

ROKHADE, A. P., AGNIHOTRI, S. A., PATIL, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., KULKARNI, P. V. & AMINABHAVI, T. M. (2006). Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. *Carbohydrate Polymers*, *65*(3), 243–252. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.013

RÓZEWICZ, M., WYZINSKA, M. & GRABINSKI, J. (2021). The Most Important Fungal Diseases of Cereals — Problems and. *Agronomy*, *11*(714).

RUBIO-MORAGA, Á., GÓMEZ-GÓMEZ, L. & TRAPERO, A. (2013). Saffron corm as a natural source of fungicides : The role of saponins in the underground. *Industrial Crops & Products*, *49*, 915–921. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.029

SALAYOVÁ, A., BEDLOVIČOVÁ, Z., DANEU, N., BALÁŽ, M., LUKÁČOVÁ BUJŇÁKOVÁ, Z., BALÁŽOVÁ, L. & TKÁČIKOVÁ, L. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using various medicinal plant extracts: Morphology and antibacterial efficacy. *Nanomaterials*, *11*(4). https://doi.org/10.3390/nano11041005

SALGADO-CRUZ, M. DE LA P., SALGADO-CRUZ, J., GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. B., CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, G., GÓMEZ-VIQUEZ, H., OLIVER-ESPINOZA, R., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M. C. & YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J. (2021). Chitosan as a coating for biocontrol in postharvest products: A bibliometric review. *Membranes*, *11*(6). https://doi.org/10.3390/membranes11060421

SAMIMI, S., MAGHSOUDNIA, N., EFTEKHARI, R. B. & DORKOOSH, F. (2019). Chapter 3 - Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00003-9

SANI, M. A., TAVASSOLI, M., HAMISHEHKAR, H. & MCCLEMENTS, D. J. (2021). Carbohydrate-based films containing pH-sensitive red barberry anthocyanins: Application as biodegradable smart food packaging materials. *Carbohydrate Polymers*, *255*(October 2020), 117488. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117488

SATHIYABAMA, M. & PARTHASARATHY, R. (2016). Biological preparation of chitosan nanoparticles and its in vitro antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 321–325. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.033

SOMRANI, M., INGLÉS, M. C., DEBBABI, H., ABIDI, F. & PALOP, A. (2020). Garlic, onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms' effect against listeria monocytogenes. *Foods*, *9*(5), 1–12. https://doi.org/10.3390/foods9050567

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

SWILAM, N. & NEMATALLAH, K. A. (2021). Polyphenols profile of pomegranate leaves and their role in green synthesis of silver nanoparticles. *Scientific Reports*, *2020*, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71847-5

SZYMAŃSKA, E., WOŚ-LATOSI, K., JACYNA, J., DĄBROWSKA, M., POTAŚ, J., MARKUSZEWSKI, M. J. & WINNICKA, K. (2020). The correlation between physical crosslinking and water-soluble drug release from chitosan-based microparticles. *Pharmaceutics*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050455

THUY, B. T. P., MY, T. T. A., HAI, N. T. T., HIEU, L. T., HOA, T. T., THI PHUONG LOAN, H., TRIET, N. T., ANH, T. T. VAN, QUY, P. T., TAT, P. VAN, HUE, N. VAN, QUANG, D. T., TRUNG, N. T., TUNG, V. T., HUYNH, L. K. & NHUNG, N. T. A. (2020). Investigation into SARS-CoV-2 Resistance of Compounds in Garlic Essential Oil. *ACS Omega*, *5*(14), 8312–8320. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00772

TSALIDIS, G. A. (2022). Human Health and Ecosystem Quality Benefits with Life Cycle Assessment Due to Fungicides Elimination in Agriculture. *Sustainability (Switzerland)*, *14*(2). https://doi.org/10.3390/su14020846

VALDIVIESO-UGARTE, M., GOMEZ-LLORENTE, C., PLAZA-DÍAZ, J. & GIL, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, *11*(11), 1–29. https://doi.org/10.3390/nu11112786

VANNINI, C., DOMINGO, G., ONELLI, E., DE MATTIA, F., BRUNI, I., MARSONI, M. & BRACALE, M. (2014). Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *171*(13), 1142–1148. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.05.002

VARSHA BHALERAO, A. & ASHOK CHAVAN, M. (2008). Isolation of filamentous fungi in post-harvest cereal grain during the storage and their effect in seed health. *International Journal of Advanced Research*, *5*(8), 2171–2177. https://doi.org/10.21474/IJAR01/5283

WASTERNACK, C. (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development - Applied aspects. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 31–39. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.009

WORANUCH, S. & YOKSAN, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles : I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, *96*(2), 578–585. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.117

XUE, Y., ZHOU, S., FAN, C. & DU, Q. (2019). Enhanced Antifungal Activities of Eugenol-Entrapped Casein Nanoparticles against Anthracnose in Postharvest Fruits. *Nanomaterials*, *9*(1777).

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»

DIPUTACIÓN
DE ALBACETE

Biblioteca Digital de Albacete «Tomás Navarro Tomás»