

MÁSTER EN  
TECNOLOGÍAS  
AVANZADAS PARA EL  
DESARROLLO  
AGROFORESTAL

# TRABAJO FIN DE MÁSTER

Determinación del efecto de diferentes compuestos bioactivos sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L.



---

**Universidad de Valladolid**

Nombre del alumno:

**Johana Catherine Ramos Tulcán**

Tutor:

**Jesús Martín Gil**

Directores:

**Petruța Mihaela Matei**

**Juan Manuel Antolín**



---

**Universidad de Valladolid**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**MASTER EN TECNOLOGÍAS AVANZADAS PARA EL DESARROLLO AGROFORESTAL**

**Trabajo de Fin de Máster**

**Determinación del efecto de diferentes compuestos bioactivos sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L.**

**Por: JOHANA CATHERINE RAMOS TULCÁN**

**TUTOR: JESÚS MARTIN GIL**

**DIRECTORES: PETRUȚA MIHAELA MATEI  
JUAN MANUEL ANTOLÍN**

**PALENCIA · JUNIO DE 2018**



## **Determinación del efecto de diferentes compuestos bioactivos sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L.**

### **RESUMEN**

El trabajo fin de Master realizado consiste en la utilización de oligómeros de quitosano (OQ), esteviósido y la  $\epsilon$ -polilisina para la formación de complejos de inclusión y complejos conjugados junto a compuestos bioactivos (polifenoles) y determinar el efecto sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. El poder bioestimulador de los composites, en el bioensayo de germinación y fitotoxicidad, se ha determinado a tres concentraciones diferentes, 125, 250 y 500 mg L<sup>-1</sup>. Para las tres concentraciones utilizadas ha podido constatarse el efecto bioestimulador de los oligómeros de quitosano en la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* y la mejora de los complejos conjugados con OQ. Al igual que el tratamiento con oligómeros de quitosano, el tratamiento con esteviósido presenta características similares en la germinación de las semillas de *L. sativa* y tienen relación con los resultados de baja toxicidad para el caso de la menor concentración. Adicionalmente, a los dos composites, a través de la espectrofotometría UV-VIS se determina la concentración de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) y el índice antioxidante (DPPH). Los constituyentes principales (oligómeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina) de los composites han sido caracterizados por técnicas de espectrofotometría (ATR-FTIR) para la determinación de los grupos funcionales (alcoholes, aminas y amidas). Utilizamos el método estadístico lineal general del análisis de varianza para el índice de germinación normalizada en función de la concentración de los complejos de inclusión y los complejos conjugados.

**Palabras claves:** germinación, fitotoxicidad, compuestos de inclusión, compuestos conjugados, esteviósido, oligómeros de quitosano,  $\epsilon$ -polilisina, líquido iónico

### **ABSTRACT**

This Master's Thesis consists in the use of oligomers of chitosan (OQ), stevioside and  $\epsilon$ -polylysine for the formation of inclusion compounds and conjugated compounds with bioactive compounds (polyphenols) and determines the effect on seed germination of *Lactuca sativa* L. The biostimulatory power of the composites, in the germination and phytotoxicity bioassay, has been determined at three different concentrations, 125, 250 and 500 mg L<sup>-1</sup>. For the three concentrations used, could be verified the biostimulatory effect of the chitosan oligomers in the germination of *Lactuca sativa* seeds and the improvement of



the conjugated OQ compounds. As the treatment with chitosan oligomers, stevioside treatment has similar characteristics in the seed germination *L. sativa* and related the results of low toxicity to the case of the lower concentration. Additionally, the concentration of total polyphenols (Folin-Ciocalteu) and the antioxidant index (DPPH) was determined by UV-VIS spectrophotometry. The main constituents (oligomers of chitosan, stevioside and  $\epsilon$ -polylysine) of the composite have been characterized by spectrophotometry techniques (ATR-FTIR) for the determination of functional groups (alcohols, amines and amides). The general linear statistical method of analysis of variance for the normalized germination index was used as a function of the concentration of the inclusion compounds and the conjugated compounds.

**Keywords:** germination, phytotoxicity, inclusion compounds, conjugated compounds, stevioside, oligomers of chitosan,  $\epsilon$ -polylysine, ionic liquids.



## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	4
2. OBJETIVOS .....	8
2.1. Objetivo general.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	9
3.1. Reactivos y material vegetal.....	9
3.2. Preparación de complejos de inclusión mediante microondas .....	9
3.3. Preparación de complejos conjugados mediante microondas.....	11
3.4. Caracterización ATR-FTIR .....	11
3.5. Determinación del contenido de polifenoles totales .....	11
3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante .....	13
3.7. Bioensayos de germinación y fitotoxicidad con semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. ....	15
4. RESULTADOS .....	19
4.1. Contenido de polifenoles totales.....	19
4.2. Capacidad antioxidante.....	20
4.3. Caracterización ATR-FTIR .....	22
4.4. Evaluación de los bioensayos de germinación de las semillas de <i>L. sativa</i> L.....	24
5. DISCUSIÓN.....	29
6. CONCLUSIONES .....	32
7. AGRADECIMIENTOS .....	33
8. REFERENCIAS.....	34



## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se requiere de la utilización de compuestos que sean capaces de mejorar las condiciones de los sistemas agrícolas en sus diferentes etapas como son: los procesos de germinación, crecimiento, desarrollo y cosecha de los cultivos, sin embargo, uno de los más grandes problemas es la utilización de sustancias químicas tóxicas, lo cual afecta tanto la salud humana y los ecosistemas. Es necesario el uso de materiales biodegradables y de bajo impacto ambiental que pueden ser utilizados como fertilizantes y/o preparados para la estimulación y protección de las semillas y plantas con la finalidad de obtener un buen rendimiento en los cultivos, por esto una de las opciones puede ser la utilización del biopolímero natural como el quitosano y un glucósido diterpeno como la estevia.

Entre las alternativas se encuentran los oligómeros de quitosano producidos a partir de la quitina de crustáceos y hongos. Su importancia radica en su carácter polifuncional, ya que permite aumentar la tasa de crecimiento funcionando probablemente como fuente de carbono o como reguladores del crecimiento, inducen resistencia hacia algunos patógenos, además de esto funcionan como atracadores de catión aumentando la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Martínez, 2011). Una de las grandes cualidades que contiene el quitosano y sus oligómeros es que pueden formar hidrogeles capaces de encapsular agroquímicos y/o fertilizantes creando sistemas de liberación controlada.

Por otra parte, este compuesto es un agente bioestimulante de la germinación de semillas, en algunos casos ha logrado elevar el porcentaje de germinación a niveles requeridos para la certificación, conllevando a mayores niveles de producción (Freepons et al., 1997; Ziani et al., 2010; Hirano y Nagano, 1989).

Según Younes (2015) el quitosano es difícilmente soluble en agua y en ácidos orgánicos. En su estado inicial la quitina contiene ordenadamente microfibrillas de cristales, que con configuración  $\beta$  de los enlaces glicosídicos, conllevan a la formación de fuertes enlaces de hidrógenos intermoleculares, por lo que se genera una estabilidad muy fuerte en la estructura. Sin embargo, uno de los problemas es la solubilidad que no permite un posterior procesamiento y uso.

Cuando la quitina es sometida a procesos de desacetilación parcial se producen los polímeros solubles en ácidos orgánicos, los quitosanos. La composición química del quitosano (polisacárido) es lineal, contiene unidades de 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D glucosa (N-acetilglucosamina) y 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucosa (N-glucosamida), unidas mediante enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4) (Figura 1), que puede poseer diferentes proporciones de N-acetilglucosamina (Sanchez, 2015).

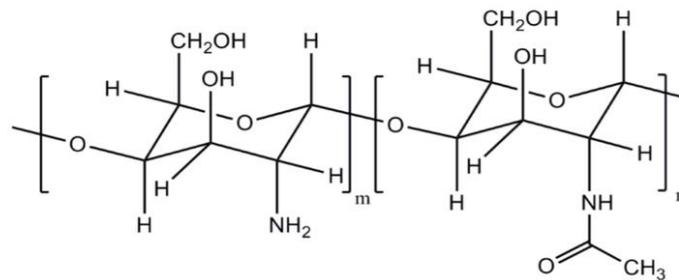


Figura 1. Estructura química del quitosano

La aplicación del quitosano ha mostrado tener efectos positivos en el crecimiento de las plantas al estimular el desarrollo radicular, de pamanos y hojas. Concluyendo de esta manera que hay una relación de proporcionalidad inversa entre el peso molecular del quitosano en relación al porcentaje de germinación y crecimiento radicular (Chirinos, 2013).

Otro componente importante es el glucósido de esteviol proveniente de la *Stevia rebaudiana* que pertenece a la familia *Asteraceae*, es una planta herbácea proveniente de Paraguay y Brasil (Goyal *et al.*, 2010). La importancia de la *Stevia r.* radica en que posee un metabolito secundario con actividad edulcorante (esteviósido) que es trescientas veces más dulce que la sacarosa utilizado así de forma natural para endulzar los alimentos siendo no perjudicial para la salud del ser humano. El esteviósido es un glucósido diterpénico que mediante los procesos de hidrólisis enzimática libera una aglucona llamada steviol. El steviol es un ácido diterpénico tetracíclico (ácido C-13-hidroxi-kaurenoico) (Figura 2), relacionado con las giberlinas (Carbonell *et al.*, 2013). Debido a la similitud estructural sugirió actividad de tipo giberélico (Mosetting *et al.*, 1963; Ruddat *et al.*, 1965), como también concuerda la vía biosintética similar al de las giberelinas y del steviol en *S. rebaudiana*. Por lo anterior Brandele (2002), afirma que la hidroxilación del ácido ent-kaurenoico en la posición C<sub>13</sub> es el punto de divergencia para generar la síntesis del esteviol y las giberelinas. Esta hidroxilación, que requiere NADPH y oxígeno molecular proveniente del estoma, es catalizada por la enzima ácido ent-kaurenoico 13-hidroxilasa (Jarma *et al.*, 2010).

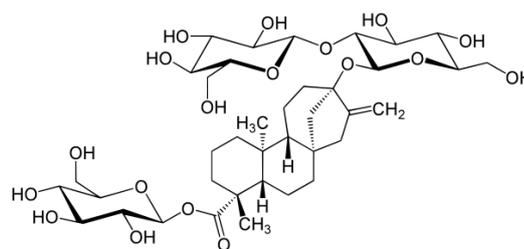


Figura 2. Estructura química del esteviósido

El esteviósido mediante pruebas biológicas específicas para giberlinas permitió establecer que el esteviol es efectivo en la estimulación del crecimiento internodal de los mutantes enanos del maíz (*Zea mays*), como también del crecimiento del hipocótilo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.), de pepino (*Cucumis sativus* L.) y de poroto (*Phaseolus vulgaris*). Por lo tanto, se deduce que el esteviósido induce la biosíntesis de  $\alpha$ -amilasa en el endospermo de cebada y tiene efecto positivo en la germinación de *L. sativa* (Vallo y Rocha, 1976).

Otro de los componentes que tienen gran importancia es el épsilon-poli-L-lisina ( $\epsilon$ -PL), (Figura 3) este es un péptido catiónico antimicrobiano natural, generalmente considerado como seguro (GRAS) y que se utiliza actualmente como conservante de alimentos. Se postula que la  $\epsilon$ -PL desestabiliza las membranas de los agentes patógenos, mediante la interacción con grupos de fosfolípidos cargados negativamente, que desplazan cationes divalentes y que conduce a la formación de vesículas/micelas en las membranas, produciendo su deformación y rotura, dado que este compuesto tiene un gran potencial, es importante determinar cómo influye como inductor de germinación (Chheda & Vernekar, 2014).

La  $\epsilon$ -polilisisina es termoestable, biodegradable y soluble en agua, sin toxicidad para la salud humana y el medio ambiente. Debido a estas características, se ha utilizado en muchas aplicaciones novedosas como es el campo de la alimentación, la medicina, el medio ambiente y la agricultura (Pandey & Kumar, 2014).

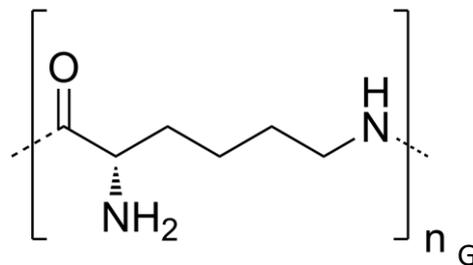


Figura 3. Estructura molecular de  $\epsilon$ -PL

Cabe destacar que el principio de todo un cultivo o de la vida de una planta se centra en la semilla por lo tanto es importante desarrollar mejores técnicas que permitan optimizar la germinación y que al final conllevaran a una buena producción de plantas, para esto se debe saber que la germinación es el cambio del estado de dormancia de la semilla debido a diferentes condiciones como temperatura, humedad, luz y oxígeno, lo que la estimula y que contribuye al crecimiento y desarrollo de la plántula. La semilla absorbe agua para al final elongar el eje embrionario.



Dentro del proceso de germinación esta la imbibición la cual consiste en la absorción de agua con la finalidad de rehidratar y permitir las reacciones hidrolíticas, posterior a esto se genera la activación del metabolismo donde se da la síntesis y degradación (síntesis de ácidos nucleicos y proteína). De igual forma también se incrementan las actividades enzimáticas y la degradación de sustancias de reservas. Y por último esta la fase en la que la radícula emerge concluyendo los procesos de germinación (Moreno & Mgnitskiy, 2006).

Es importante destacar que existen factores que afectan la germinación de la semilla como madurez de la semilla (ausencia de germinación por falta de hidratación adecuada), la viabilidad de la semilla (tiempo durante el cual la semilla está en capacidad de germinar) y factores externos como la humedad y la temperatura. El agua entra a la semilla por diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que la rodea, sin embargo, si hay un exceso de agua se puede producir la baja oxigenación en la semilla. La temperatura permite el rompimiento de la latencia y determina la capacidad y la tasa de germinación (Cuevas & Arroyo, 1999).

La luz puede estimular la germinación en algunas especies de semillas que están medidas por la acción del fitocromo, es una cromoproteína soluble que contiene dos subunidades cada una con 1200 aminoácidos y una masa molecular de 123 kdalton. Por tal razón se puede generar que se estimule la germinación bajo condición de iluminación (longitud de onda 660 nm) y por otra parte puede existir la que inhiba que se da en condiciones de oscuridad (longitud de onda 730nm) (Rueddas & Argüero, 2000).

La germinación se ve afectada por todos los factores que se nombraron anteriormente, es por eso que mediante este estudio se pretende analizar y determinar la función de inductores en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. mediante complejos de inclusión y complejos conjugados conformados por oligómeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. de los complejos de inclusión y los complejos conjugados en base a oligómeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina en combinación con diferentes compuestos bioactivos (ácido gálico, ácido ferúlico, silimarina y curcumina).

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar el contenido en polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) y evaluar la capacidad antioxidante (DPPH) de los composites analizados formados por los complejos de inclusión y los complejos conjugados en combinación con los compuestos bioactivos (polifenoles).
- Caracterizar mediante espectroscopia (ATR-FTIR) con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) a los principales constituyentes (oligomeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina) de los complejos de inclusión y los complejos conjugados analizados.
- Evaluar los bioensayos de germinación y fitotoxicidad (% GRS, %CRR, % IG e IGN) en semillas de *L. sativa* L., con diferentes concentraciones (125, 250 y 500  $\text{m L}^{-1}$ ) de los complejos de inclusión y conjugados con compuestos bioactivos.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. Reactivos y material vegetal.

Los reactivos utilizados en esta evaluación son: ácido gálico, silimarina, steviósido, esteviósido, ácido ferúlico, curcumina, cloruro de colina, urea, aceite de Neem, glicerina,  $\epsilon$ -polilisina y ácido abiético que se adquirieron de la casa comercial de Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EE. UU.).

Se utilizó oligómeros de quitosano a partir de quitosano de peso molecular medio de Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd (Hangzhou, China), se disolvió 10 g en 500 ml de ácido acético (1%) con ayuda de agitación constante a 60°C. Posterior, se agregó peróxido de hidrógeno (0,3 mol L<sup>-1</sup>) con la finalidad de degradar la cadena del polímero y así obtener oligómeros de 2000 g mol<sup>-1</sup> (Sun *et al.*, 2007).

La licuefacción de las mezclas eutécticas (DES) cloruro de colina y urea (1: 2 v / v) se produjo a 80°C bajo agitación en un agitador magnético de placa caliente durante 10 min, de acuerdo con Biswas (2006).

Para la caracterización de polifenoles se utilizó reactivos como Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio anhidro (N<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) de Panreac®. La preparación del Folin-Ciocalteu se hizo mediante la mezcla de 25 ml de agua destilada y se adiciona carbonato sódico con la finalidad de obtener un pH a 7,4, posterior a esto se agregó 5 ml de Folin-Ciocalteu (Martinez *et al.*, 2015).

Las semillas utilizadas para el bioensayo de germinación son provenientes de la casa comercial Batlle, correspondiente a lechuga crispilla amarilla (*Lactuca sativa* L. var. Batavia).

#### 3.2. Preparación de complejos de inclusión mediante microondas

Los reactivos fueron colocados en jarras de microondas con sus respectivas tapas y tornillos, se realizaron dos tipos de matrices (a) en solución hidroalcohólica con oligómeros de quitosano (Q) y (b) en líquidos iónicos profundos (DES).

### 3.2.1. Compuestos de inclusión en solución hidroalcohólica con oligómeros de quitosano

En cuatro jarras de microondas con tapa de rosca se añadió 40 ml de solución hidroalcohólica (HS) (1:1 agua destilada y etanol), (0,6 g) de esteviósido y 0.1 g de polifenoles (ácido gálico, silimarina, ácido ferúlico y curcumina) respectivamente [6:1] (Tabla 1) añadiendo (0,1 g) de oligómeros de quitosano de 2000 Da, y seguidamente se introduce en el microondas (75% de agitación) (Milestone Ethos-One microwave) (Figura 4) a 80°C, 20 min. Por ultimo las soluciones son centrifugadas a 2500 rpm y se almacenan a 4°C, se realizan tres repeticiones por tratamiento.

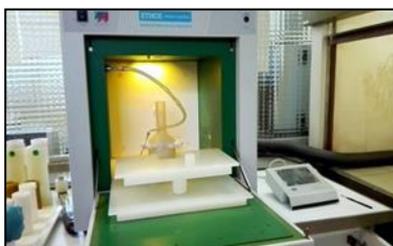


Figura 4. Microondas (Milestone Ethos-One microwave)

Tabla 1. Descripción de las muestras sometidas a microondas

Temperatura/Tiempo	Ratio	Descripción	Código	
<b>60°C A 20 minutos</b>	6:1	S + SH.	A7	
		S+Ga+OQ	A12	
		S + Sy + + OQ	B1	
		S +F + OQ	B2	
		S + C + OQ	B3	
	3:1	S + Ga+ DES	B4	
		S+ Sy+ DES	B5	
		S + F +DES	B6	
		6:1	E + SH	B7
			S + C+ DES	B8
		S +N+ DES	B10	

\*Acido Gálico (**Ga**), Steviósido (**S**), Acido Ferúlico (**F**), Curcumina (**C**), Oligómeros de Quitosano (**OQ**), Aceite de Neem (**N**), Esteviósido (**E**), Etanol (**Eth**), Solución Hidroalcohólica (agua y etanol 1:1) (**SH**), Solución (liquido iónico y glicerina 2:1) (**DES**).



### **3.2.2. Complejos de inclusión en líquidos iónicos profundos (DES)**

Se añadieron 20 ml de líquido iónico profundo (DES) en cuatro frascos con tapas de rosca de microondas y en cada uno (0,3 g) esteviósido y 0,1 g polifenoles (ácido gálico, silimarina, ferúlico ácido y curcumina) respectivamente relación [3: 1] (Tabla 1). La mezcla de prueba se calentó (80°C) bajo radiación de microondas (agitación del 75%) durante 20 minutos (Milestone Ethos-One microwave) (Figura 4) con tres repeticiones por tratamiento.

## **3.3. Preparación de complejos conjugados mediante microondas**

### **3.3.1. Complejos conjugados (oligómeros de quitosano y $\epsilon$ -polilisina)**

Para la preparación del complejo conjugado se utilizó 40 ml de oligómeros de quitosano con 0,8 g de  $\epsilon$ -polilisina. Para la preparación de las muestras a estudiar se tomaron 10 ml de la anterior disolución oligómeros de quitosano- $\epsilon$ -polilisina en diferentes tubos con tapaderas a los que se agregaron 0,2 g de colofonia (muestra J), ácido gálico (muestra K) y ácido ferúlico respectivamente (M), la mezcla de prueba se calentó (80°C) bajo radiación de microondas (agitación del 75%) durante 20 minutos (Milestone Ethos-One microwave) (Figura 4) y se prepararon tres repeticiones por tratamiento.

## **3.4. Caracterización ATR-FTIR**

La caracterización mediante la espectrofotometría permite cuantificar la luz que puede absorber los composites, de forma que mide la intensidad de la luz cuando un haz luminoso atraviesa la solución de cada muestra, permitiendo de igual forma poder cuantificar la cantidad de producto químico conocido en los composites. Esto es posible ya que se basa en la ley de Beer-Lambert.

Los espectros de infrarrojos se registraron con un aparato Thermo Nicolet 380 FT-IR equipado con un sistema Smart Abit Diamond (ATR), con el fin de identificar los grupos funcionales químicos (Figura 5).



Figura 5. Equipo ATR-FTIR (Thermo Nicolet 380 FTIR- ATR)

### 3.5. Determinación del contenido de polifenoles totales

Para la medición de los polifenoles totales se utiliza el método colorimétrico utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para la cuantificación de los polifenoles se utilizó la curva patrón de ácido gálico.

#### a. Solución madre de ácido gálico

La preparación de la solución madre de ácido gálico se utilizó 50 mg de ácido galica en 100 ml de agua destilada. Una vez obtenido esta disolución se procede a tomar de ella 10 ml y se vuelve a disolver en 100 ml, e igualmente se prepara la solución de carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) disolviendo 14,84 g en 200 ml de agua destilada. Las dos soluciones preparadas se utilizan tanto para las muestras como para la curva patrón (Martínez *et al.* 2015).

Se toma la disolución de ácido gálico anteriormente nombrada y se la lleva a diferentes concentraciones con agua destilada para obtener la curva patrón (

Tabla 2), además de esto a cada muestra se añade 0,1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y 0,4 ml de la disolución de carbonato sódico (Figura 6).

Tabla 2. Curva patrón del ácido gálico

Reactivos	Disoluciones								
	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A9
Ácido Gálico (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
Agua (ml)	10	9,8	9,6	9,4	9,2	9,0	8,8	8,6	8,4

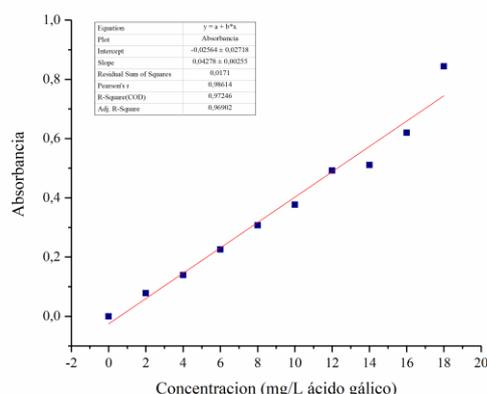


Figura 6. Curva patrón de ácido gálico

### b. Preparación de muestras con complejos bioactivos

Para este procedimiento se agregaron en el siguiente orden las muestras y reactivos: primero se adiciona un 1 ml de la muestra, 9 ml de agua destilada, 0,1 ml de Folin-Ciocalteu y por último 0,4 ml de carbonato sódico. Después de la preparación de las muestras se las deja reposar a temperatura ambiente, en un lugar oscuro, durante una hora y media o dos. 300  $\mu$ l de la muestra preparada anteriormente se colocar en placas planas para la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific™ Multiskan GO) (Figura 7) a una absorbancia a 765 nm.



Figura 7. Equipo Uv-VIS (Thermo Scientific™ Multiskan GO)

## 3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante

### • Preparación de la solución DPPH (P/V)

Para esto se utilizó 10 mg de DPPH disuelto en 25 ml de metanol al 99%, esta solución se guarda en la oscuridad.



- **Preparación de solución de ácido ascórbico**

En 25 ml de agua destilada se agregaron 52 mg de ácido ascórbico.

- **Curva patrón con ácido ascórbico**

De la solución de ácido ascórbico se llevaron a diferentes concentraciones (Tabla 3) (Figura ) y posterior a esto a cada muestra sea agregó 20 µl de DPPH.

Tabla 3. Curva patrón con ácido ascórbico

Reactivos	Disoluciones							
	A0	A1	A2	A3	A4	A6	A7	A8
Ácido ascórbico (µl)	300	250	200	150	100	50	-	-
Metanol (µl)	0	50	100	150	200	250	-	200
Agua (µl)	-	-	-	-	-	-	200	-

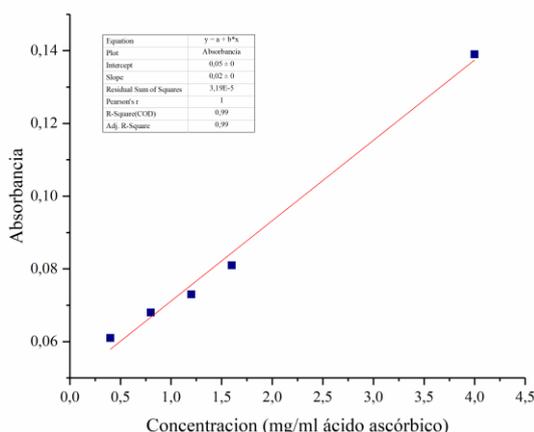


Figura 8. Curva patrón ácido ascórbico

**a. Preparación de las muestras**

Se toman 300 µl de las muestras y se las coloca en placas, se añade 30 µl de DPPH, se deja reposar durante 30 minutos en la oscuridad y se procede a realizar la lectura en el espectrofotómetro UV-VIS a 715 nm (Figura 7).

Según Toledo (2016), la actividad antioxidante se expresa como el porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Blanco}}} \times 100$$



donde,

I%= Porcentaje de inhibición

$A_{Blanco}$  = Absorbancia de la muestra de reacción control (tiene todos los reactivos excepto el extracto ensayado)

$A_{Muestra}$  = Absorbancia de la muestra de reacción con el extracto ensayado

Utilizamos el 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) para la determinación de la capacidad antioxidante (%), tanto para los composites que contienen los complejos de inclusión como para los compuestos conjugados.

### **3.7. Bioensayos de germinación y fitotoxicidad con semillas de *Lactuca sativa* L.**

Los bioensayos para determinar la germinación y fitotoxicidad de los composites, se dividieron en dos partes: los tratamientos con complejos de inclusión y por otro lado tratamientos con complejos conjugados los dos en combinación con compuestos bioactivos (polifenoles) más el testigo con un total de 17 tratamientos, llevando cada tratamiento a tres concentraciones diferentes de 125, 250 y 500 mg L<sup>-1</sup> y en tres repeticiones. Evaluar los bioensayos de germinación y fitotoxicidad (% GRS, %CRR, % IG e IGN) sobre las semillas de *Lactuca sativa* L. (Tabla 4.), resulta un total de 135 cajas Petri. En cada caja Petri de 100 mm de diámetro se colocó tres circunferencias de 90 ml de diámetro de papel filtro (Whatman nº1), de acuerdo a Zucconi (1989). Se adiciona un determinado volumen del composite dependiendo de las diferentes concentraciones como se indica en la Tabla 4. Posterior a ello se tomaron 10 semillas de *Lactuca sativa* L. y con ayuda de una pinza se colocan de una a una en cada caja Petri, teniendo en cuenta dejar espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces. Las cajas se llevaron a la incubadora (JP Selecta) (Figura 8 durante 120-180 h a 24 ± 2 °C en la oscuridad.



Figura 8. Incubadora (JP Selecta)



Tabla 4. Concentraciones para complejos de inclusión y conjugados

Nomenclatura	Muestra complejo bioactivo	Solución a pipetear (mL)		
		125 mg L <sup>-1</sup>	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>
<b>A7</b>	S+ SH	0,81	1,62	3,25
<b>A12</b>	S+Ga+OQ	0,61	1,40	2,80
<b>B1</b>	S + SY+ OQ	0,65	1,30	2,59
<b>B2</b>	S + F + OQ	0,71	1,42	2,84
<b>B3</b>	S + C + OQ	0,63	1,27	2,53
<b>B4</b>	S + Ga + DES	0,30	0,60	1,20
<b>B5</b>	S + Sy + DES	0,26	0,53	1,05
<b>B6</b>	S + F + DES	0,40	0,81	1,62
<b>B7</b>	E + SH	0,83	1,66	3,32
<b>B8</b>	S + C + DES	0,53	1,06	2,13
<b>B10</b>	S + N + DES	0,51	1,03	2,06
<b>Q</b>	OQ	0,06	0,13	0,25
<b>Testigo</b>	Agua destilada	-	-	-
<b>Muestra complejo conjugado</b>				
<b>J</b>	Aa + εPI -OQ	0,13	0,25	0,50
<b>K</b>	Ga+ εPI -OQ	0,13	0,25	0,50
<b>M</b>	F+ εPI -OQ	0,13	0,25	0,50
<b>e-PI</b>	εPI	0,13	0,25	0,50
<b>Testigo</b>	Agua destilada	-	-	-

\*Acido Gálico (**Ga**), Steviósido (**S**), Acido Ferúlico (**F**), Curcumina (**C**), Oligómeros de Quitosano (**OQ**), Aceite de Neem (**N**), Esteviósido (**E**), Etanol (**Eth**), Oligómeros de quitosano vía química (**Q**), Solución Hidroalcohólica (agua y etanol 1:1) (**SH**), Solución (liquido iónico y glicerina 2:1) (**DES**), Ácido abietico (**Aa**), ε-polilisina con Oligómeros de Quitosano (**EPL-OQ**), e-PI (ε-Polilisina),

Las semillas con agua destilada son consideradas como testigo. Pasado el tiempo establecido se procedió a realizar el conteo del número de semillas germinadas, consideras solo aquellas con longitud radical mayor a 1 mm (Di Salvatore et al. 2008). También se realizó mediciones cuidadosamente de la longitud de la raíz y del hipocótilo de cada una de las plántulas, que corresponden a las diferentes concentraciones de las sustancias de ensayo y el testigo. Para cada dilución se realizó el cálculo del promedio de elongación de la raíz y el hipocótilo para posterior ser utilizados en la fórmula de porcentaje de germinación.

Para la determinación del índice de germinación se utilizaron las siguientes fórmulas de acuerdo a Rodríguez *et. al.* (2014):

$$\%GRS = \frac{NSGM}{NSGT} \times 100$$

$$\%CRR = \frac{LPRM}{LPRT} \times 100$$



$$\%IG = \frac{GRS \times CRR}{100}$$

donde,

NSGM=Numero de semillas germinadas con el composite

NSGT=Numero de semillas germinadas con agua (testigo)

LPRM=Longitud promedio de la radícula con el composite

LPRT=Longitud promedio de la radícula del testigo

Para el cálculo de índice del porcentaje de germinación residual normalizado se utilizó la siguiente formula según Rodríguez *et al.* (2014):

$$IGN = \frac{Gmp \times Gt}{Gt}$$

donde,

Gm= Porcentaje promedio de semillas germinadas con el composite

Gt = Porcentaje de semillas germinadas en el testigo

### 3.7.1. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la variable índice de porcentaje de germinación residual normalizado (IGN) se ha utilizado un modelo lineal general de análisis de la varianza con la siguiente formulación:

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_{k(ij)} + \delta_{l(ij)} + \gamma\delta_{kl(ij)} + \varepsilon_{ijklm}$$

con  $i=1$  (primer experimento),  $2$  (segundo experimento);  $j=1$  (con quitosano),  $2$  (sin quitosano, testigo);  $k(11)=1$  (A7),  $2$  (B1),  $3$  (B2),  $4$  (B7),  $5$  (Q);  $k(12)=1$  (T, testigo en el experimento 1);  $k(21)=1$  (J),  $2$  (K),  $3$  (M);  $k(22)=1$  (T, testigo en el experimento 2);  $l(11)=1$  (concentración 125),  $2$  (concentración 250), (concentración 500);  $l(12)=1$  (sin concentración, testigo en el experimento 1);  $l(21)=1$  (concentración 125),  $2$  (concentración 250);  $l(22)=1$  (sin concentración, testigo en el experimento 2);  $m=1,2,3$  para las réplicas de cada uno de los 23 tratamientos; y siendo:

$Y_{ijklm}$  = valor observado para la variable IGN en la réplica  $m$  del tratamiento  $k(ij)$  con la concentración  $l(ij)$  en el experimento  $i$ .

$\mu$  = efecto de media general para la variable IGN.

$\alpha_i$  = efecto principal del experimento  $i$ .



$\beta_j$  = efecto principal de la sustancia  $j$  (quitosano o agua).

$\alpha\beta_{ij}$  = interacción del experimento  $i$  con la sustancia  $j$ .

$\gamma_{k(ij)}$  = efecto principal del tratamiento  $k(ij)$ .

$\delta_{l(ij)}$  = efecto principal de la concentración  $l(ij)$ .

$\gamma\delta_{kl(ij)}$  = interacción del tratamiento  $k(ij)$  con la concentración  $l(ij)$ .

$\varepsilon_{ijklm}$  = error aleatorio en el valor observado de la variable IGN para la réplica  $m$  del tratamiento  $k(ij)$  con la concentración  $l(ij)$  en el experimento  $i$ , con  $\varepsilon_{ijklm} \sim N(0, \sigma^2)$ , siendo  $\sigma^2$  la varianza aleatoria para los errores.

El ajuste del modelo y todos los test estadísticos se hicieron utilizando el paquete estadístico STATISTICA 6.0. Las comparaciones de medias se hicieron utilizando pairwise t-tests para todos los pares de medias, y la normalidad de los residuales se comprobó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre los datos de los tratamientos fueron considerado significativo a  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Contenido de polifenoles totales.

#### 4.1.1. Complejos de inclusión

En la Figura 9 se puede ver el contenido de polifenoles totales para los complejos de inclusión en solución hidroalcohólica (SH), en líquidos iónicos profundos (DES) y con oligómeros de quitosano (OQ). Se observa que el contenido de polifenoles en los composites vario desde 1,87 mg Eq. ácido gálico/100 ml hasta 26,2 mg Eq. ácido gálico/100 ml. resultando que los complejos de inclusión con medio de OQ presenta el valor mas alto, por el contrario de los DES y SH (Figura 10).

EL mejor composite es S+Ga (A12) con contenido de polifenoles de 26,2 mg Eq. ácido gálico/100 ml a diferencia del composite E(B7) con 1,87 mg Eq. ácido gálico/100 ml.

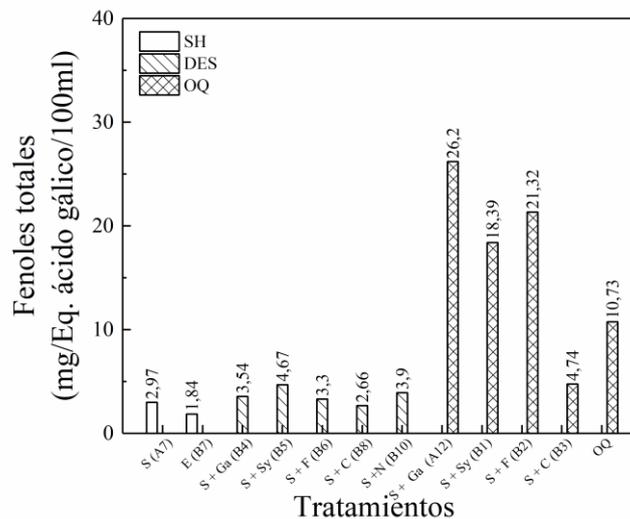


Figura 9. Contenido de polifenoles totales para complejos de inclusión

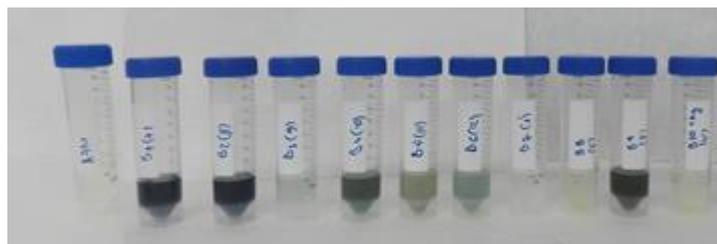


Figura 10. Polifenoles totales en complejos de inclusión

### 4.1.2. COMPLEJOS CONJUGADOS

Se determinó que para los composites conjugados el mayor contenido en polifenoles totales es para Aa+Eth (J) con 20,39 mg Eq. ácido gálico/100 ml a diferencia del Ga+W (K) con 14,73 mg Eq. ácido gálico/100 ml. Sin embargo, es necesario resaltar que estos dos tratamientos tienen contenidos mayores de polifenoles con relación a la muestra que solo tiene EPL, siendo este el que tiene el menor contenido de polifenoles en relación a todas los demás (10,02 mg Eq. ácido gálico/100 ml) (Figura 11).

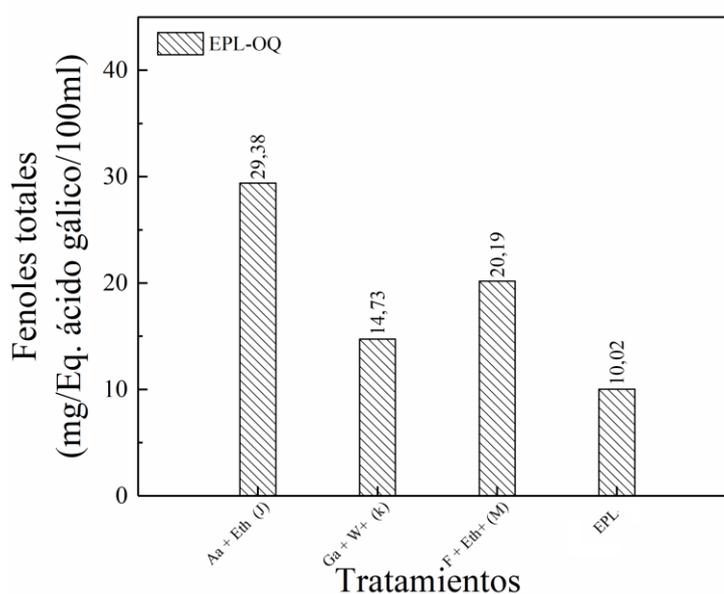


Figura 11. Contenido de polifenoles totales para complejos conjugados

## 4.2. Capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos están expresados en porcentaje de inhibición. Para los complejos de inclusión (Figura 12) se puede determinar que la mayoría de los composites presenta una elevada capacidad antioxidante. Destacamos que los tratamientos que contienen oligómeros de quitosano S+Ga (A12) y S+C (B3) presentan el mayor porcentaje de inhibición de 79,81% y 79,69% respectivamente, y el menor porcentaje de inhibición es de los complejos de inclusión conformado por líquidos iónicos (DES) con S+N (B10) 29,51%.

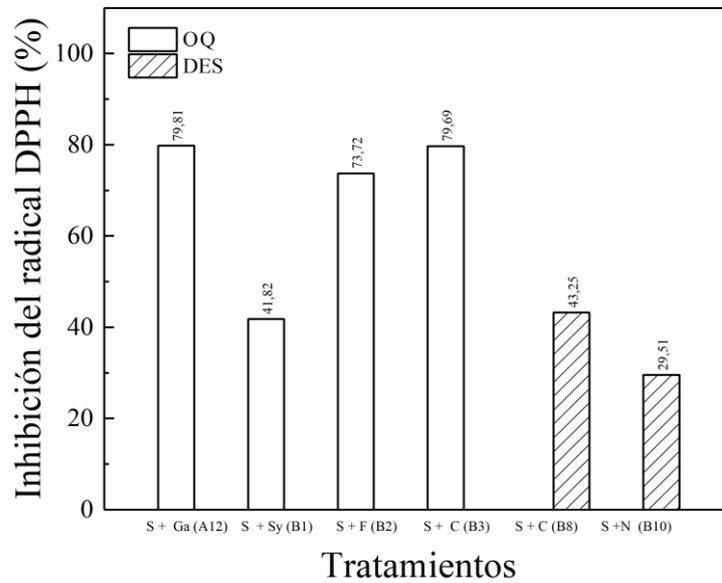


Figura 12. Porcentaje de inhibición radical DPPH para complejos de inclusión

Para los complejos conjugados el tratamiento que está conformado por  $\epsilon$ -polilisisa-oligómeros de quitosano F+Eth (M) tiene el porcentaje mayor en relación a los demás (80,88%), sin embargo la muestra que contiene  $\epsilon$ -polilisisa-oligómeros de quitosano Aa+Eth (J) posee el más bajo poder antioxidante (11,35%) (Figura 13).

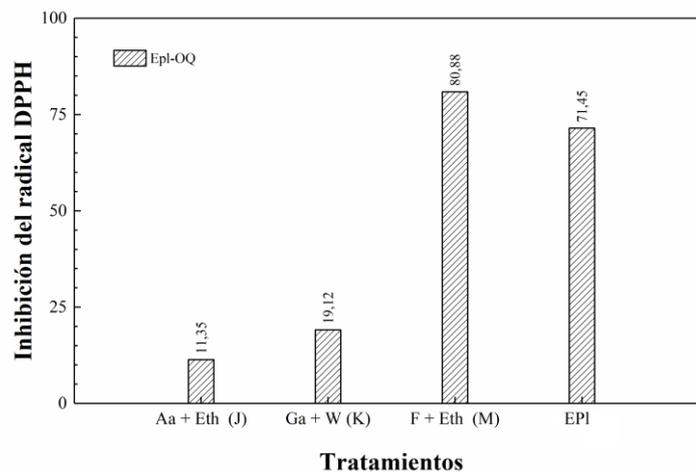


Figura 13. Porcentaje de inhibición radical DPPH para complejos conjugados

### 4.3. Caracterización ATR-FTIR

Uno de los objetivos de este estudio fue la identificación los grupos funcionales químicos de los constituyentes de los composites utilizando la técnica (ATR-FTIR). En la Figura 14 se encuentran los espectros FTIR, con las bandas espectrales, características de las muestras de oligómeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina, los principales constituyentes de los complejos de inclusión y complejos conjugados analizados.

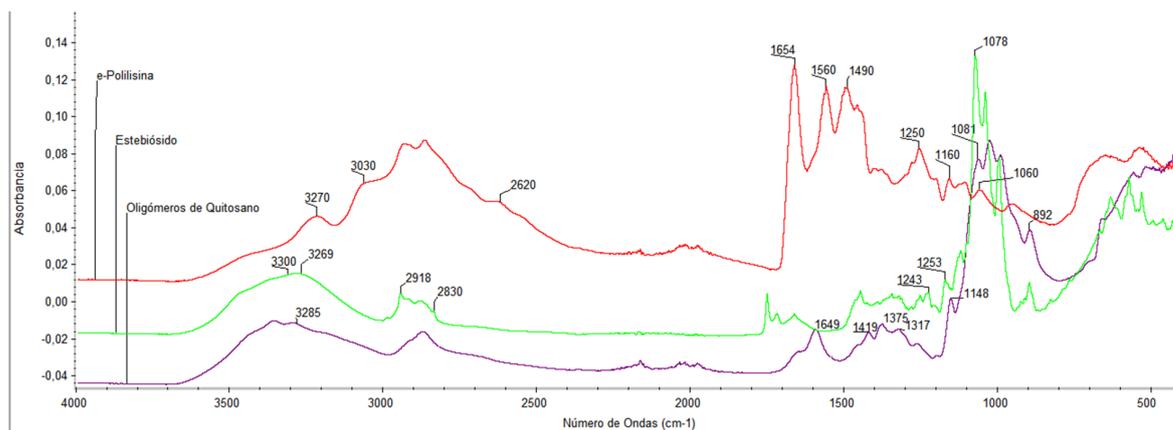


Figura 14. Espectros ATR-FTIR de oligómeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina

Observamos en el espectro de ATR-FTIR de la muestra de oligómeros de quitosano, las bandas correspondientes a los estiramientos O-H y N-H ( $3250\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ ), características de alcoholes, aminas y amidas presentes en la estructura del sólido desacetilado. Las bandas características a  $2840\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con el grupo C-H y la banda a  $1649\text{ cm}^{-1}$  originada por estiramiento de los grupos C=O y N-H, características al grupo amida (tabla 5). Las bandas asignadas a  $1419\text{ cm}^{-1}$  se deben a un grupo amida (II). La banda de absorción relativa a deformaciones del grupo amina se observa a  $1548\text{ cm}^{-1}$ , mientras que la banda centrada en  $1317\text{ cm}^{-1}$  de las vibraciones del estiramiento del grupo metil (C-H) presente en el grupo acetamido residual, produce deformaciones debido a la desacetilación incompleta de la quitina. En la banda  $892\text{ cm}^{-1}$  encontramos los polímeros de quitosano ( $\text{CH}_2=\text{CR}$ ). El quitosano es un polisacárido compuesto de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina y que, al encontrarse expuesto a ambientes ricos en grupos funcionales, caso de los complejos de inclusión o complejos conjugados utilizados en nuestro trabajo, puede interactuar formando nuevas uniones y generar agudizaciones en las bandas espectrales.



Tabla 5. Las principales bandas espectrales ATR-FTIR obtenidas para los oligómeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina. Longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Oligómeros de Quitosano	Esteviósido	$\epsilon$ -polilisina	Asignación
3285	3300 3269	3270 3200 3030	$\nu(\text{OH})$ overlapped to $\nu_s(\text{N-H})$ (Matei et al., 2015); (Delgado et al., 2009); (Rozenberg & Shoham., 2007)
	2918 2830	2620	$\nu_s(\text{C-H})$ in $-\text{CH}_3$ (Matei et al., 2015); (Delgado et al., 2009); (Rozenberg & Shoham., 2007)
1649	1663	1654	$\nu$ ( $-\text{C}=\text{O}$ ) of the amide group $\text{CONHR}$ in chitosan and $\nu$ ( $-\text{C}=\text{O}$ ) of flavonoids and lipids, found in propolis /aromatic ring deformations (Matei et al., 2015), (Rozenberg & Shoham., 2007)
1548		1550 1490	( $-\text{C}=\text{O}$ ) protonated amide group $\delta(\text{NH}_3)$ protonated amine group. (Rozenberg & Shoham., 2007)
1419			(OH). (Matei et al., 2015)
1375			( $-\text{CH}_3$ ). (Matei et al., 2015)
1317	1253 1243	1250	$\nu_s(-\text{CH}_3)$ tertiary amide $\omega(-\text{CH}_2) + \text{OH}$ in-plane deformation. (Matei et al., 2015); (Delgado et al., 2009); (Rozenberg & Shoham., 2007)
1148	1198	1160	$\nu_{as}(\text{CO})$ in oxygen bridge resulting from deacetylation of chitosan. (Matei et al., 2015), (Rozenberg & Shoham., 2007)
1081	1078	1060	(CO) of the ring $\text{C-O-H}$ , $\text{C-O-C}$ and $\text{CH}_2\text{CO}$ . (Matei et al., 2015); (Delgado et al., 2009); (Rozenberg & Shoham., 2007)
892	746		$\omega(\text{C-H})$ of the saccharide structure. (Matei et al., 2015)

El análisis vibratorio de esteviósido proporciona las vibraciones específicas de las moléculas de glucosa y el alcohol carboxílico diterpenoico con las características bandas en 1663, 1198, 1078, 746  $\text{cm}^{-1}$  (tabla 5). El esteviósido se encuentra en las hojas de *Stevia rebaudiana* que además contienen otros componentes dulces como esteviolbiosido, rebaudiósido, este último es un steviol-tetraglucósido. Se puede observar que las características espectrales del esteviósido están muy bien marcadas en la intensidad relativa de las bandas en el rango de 746-1663  $\text{cm}^{-1}$ , e IR demuestra la banda de carbonilo de esteviol glucósido cerca de 1750  $\text{cm}^{-1}$  con mayor intensidad relativa y una banda de hombro más débil cerca de 1730  $\text{cm}^{-1}$ . Picos medios a débiles observados entre 1200-1300  $\text{cm}^{-1}$  (1243 y 1253  $\text{cm}^{-1}$ ) en los espectros representan el grupo carboxilato y las vibraciones producidas por el grupo O-H determinados de grupos funcionales de alcohol o de los grupos COOH. Estos grupos están presentes con gran frecuencia y representan los grupos reductores del esteviósido



determinando la oxidación y la estabilización en el caso de los complejos de inclusión formados.

En el espectro de la  $\epsilon$ -polilisina se observan las dos características proeminentes, tres bandas superpuestas que dan como resultado una absorbancia muy amplia ( $350\text{ cm}^{-1}$ ) en el rango  $3300\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  y un grupo de bandas cerca de  $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  (tabla 5). Las tres bandas a  $3270\text{ cm}^{-1}$ ,  $3200\text{ cm}^{-1}$  y  $3030\text{ cm}^{-1}$  en el rango espectral corresponden a los estiramientos O-H y N-H, características de alcoholes, aminas y amidas les encontramos presentes en la estructura del sólido  $\epsilon$ -polilisina. La intensidad máxima de la banda a  $3030\text{ cm}^{-1}$  se asigna a los modos  $\nu$  de grupos de cadenas laterales  $\text{NH}_3$  protonados. La asignación de la banda a  $1620\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ) se refiere a la amida I (principalmente grupo CO). La deformación prominente por el grupo NH (amida II) se observa en la banda a  $1550\text{ cm}^{-1}$ . Bandas de deformación por el grupo amida  $\text{NH}_3^+$  también se encuentra en el rango  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Ambas bandas se relacionan con la vibración producida por los grupos peptídicos.

Los espectros ATR-FTIR aportan información sobre las similitudes entre los tres constituyentes principales de los composites (oligómeros de quitosano, esteviósido y  $\epsilon$ -polilisina). Observamos que existen similitudes entre los espectros de oligómeros de quitosano y esteviósido, los dos constituyentes estimulan el proceso de germinación de las semillas de *L. sativa*.

#### **4.4. Evaluación de los bioensayos de germinación de las semillas de *L. sativa* L.**

- **Porcentaje de germinación relativa (%GRS) para el tratamiento con los complejos de inclusión.**

En la Tabla 6, se indica los valores de %GRS para los complejos de inclusión que contiene OQ, DES y SH, con las diferentes mezclas de complejos bioactivos. La concentración  $125\text{ mg L}^{-1}$  influye en el mayor porcentaje de germinación en todos los tratamientos, por otra parte, el tratamiento que solo contiene OQ presenta un porcentaje de 107,41% de germinación siendo este porcentaje el mejor (Figura 14), incluso mejor que del propio testigo (agua).

En cuanto al tratamiento que contiene esteviósido en solución hidroalcohólica (A7) observamos 100% de germinación en comparación con los líquidos iónicos profundos y los oligómeros de quitosano.

Los tratamientos determinan la inhibición de la germinación son los que están constituidos por complejo de inclusión de DES y OQ en combinación con compuestos S-C, S-Ga y S-N respectivamente (B4, A12, B8, B3 y B10).

Tabla 6. Porcentaje de germinación relativa (GRS %), porcentaje relativo de la radícula (CRR%) e índice de germinación (IG %) para las semillas de *L. sativa* en complejos de inclusión

	S+Ga		S+Sy		S+F		S+C		S+N	S	E	OQ	
	OQ	DES	OQ	DES	OQ	DES	OQ	DES	DES	HS	HS	-	T
GRS (%)	0	0	10,53	0	52,63	0	0	0	0	100	88,89	107,41	103,70
125 mg L <sup>-1</sup> CRR (%)	0	0	4,54	0	57,82	0	0	0	0	100	44,44	111,1	100,00
IG (%)	0	0	0,72	0	30,43	0	0	0	0	100	0,00	107	103,70
GRS (%)	0	0	26,32	0	21,05	0	0	0	0	0	53,83	77,34	
250 mg L <sup>-1</sup> CRR (%)	0	0	22,22	0	16,33	0	0	0	0	0	14,14	51,11	
IG (%)	0	0	5,85	0	3,44	0	0	0	0	0	0,00	3,24	
GRS (%)	0	0	0,86	0	5,26	0	0	0	0	0	47,85	83,07	
500 mg L <sup>-1</sup> CRR (%)	0	0	0,86	0	11,34	0	0	0	0	0	6,28	56,78	
IG (%)	0	0	0,86	0	0,60	0	0	0	0	0	0,00	3,47	



Figura 15. Germinación de las semillas de *L. sativa* para el tratamiento con oligómeros de quitosano (Q) a diferentes concentraciones



- **Porcentaje de germinación relativa (%GRS) para el tratamiento con los complejos conjugados**

El tratamiento que contiene complejos conjugados conformado  $\epsilon$ -PI-OQ en combinación con el componente bioactivo Ga (tratamiento k), presenta una alta germinación de 126,32% a la concentración de 250 mg L<sup>-1</sup> y el menor porcentaje de germinación es de 52,32% para los tratamientos que contienen el complejo conjugado con Ga y F respectivamente (tratamiento J, M) a la concentración de 250 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de germinación relativa (GRS %), porcentaje relativo de la radícula (CRR%) e índice de germinación (IG %) para semillas de *L. sativa* en complejo conjugado

		$\epsilon$ - PI+OQ			T
		Aa	Ga	F	
125mg L <sup>-1</sup>	GRS (%)	63,16	89,47	73,68	100
	CRR (%)	93,88	91,16	39,46	100
	IG (%)	59,3	81,6	29,1	100
250 mg L <sup>-1</sup>	GRS (%)	52,63	126,32	52,63	
	CRR (%)	31,29	36,73	8,84	
	IG (%)	16,47	46,40	4,65	
500mg L <sup>-1</sup>	GRS (%)	0	0	0	
	CRR (%)	0	0	0	
	IG (%)	0	0	0	

- **Porcentaje relativo de la radícula (%CRR) para el tratamiento con los complejos de inclusión**

Para él (%CRR) los mayores valores (111,1%) les encontramos para los tratamientos con complejos de inclusión a base de oligómeros de quitosano (OQ). El comportamiento de la longitud de la radícula en relación con la concentración es inversamente proporcional, a menor concentración 125 mg L<sup>-1</sup> se observa mayor crecimiento de la radícula. Los valores más altos en orden decreciente para el porcentaje relativo de la radícula (%CRR) son las siguiente: S (HS) con 100%, S+F (B2) (OQ) con 57,82% y E (HS) con 44,44% como se indica en la Tabla 6.



- **Porcentaje relativo de la radícula (%CRR) para el tratamiento con los complejos conjugados**

Se puede observar en la Tabla 7, el porcentaje (%CRR) mayor de 93,88% corresponde a la concentración de 125 mg L<sup>-1</sup> y que contiene la unión de  $\epsilon$ -PI+OQ con Aa (J) y el menor porcentaje (CRR 39,46%) corresponde a  $\epsilon$ -PI+OQ en combinación del compuesto bioactivo F (M) a concentración de 250 mg L<sup>-1</sup>. Cabe destacar que el testigo tiene el mejor porcentaje (100%) con relación a las demás muestras estudiadas.

- **Índice de germinación (% IG) para el tratamiento con los complejos de inclusión**

En la Tabla 6, al igual que las otras dos variables el índice de germinación también se ve afectado por la concentración, presentándose que el mejor índice es para la concentración de 125 mg L<sup>-1</sup> y el índice más bajo de germinación es para la concentración de 500 mg L<sup>-1</sup>.

Entre los tratamientos con complejos de inclusión el mayor porcentaje de (IG 100%) es para la S (HS). Al igual que en los otros casos IG tiene un valor muy alto en las combinaciones con OQ (IG 107%) mayor que el testigo (IG 103,70%).

- **Índice de germinación (% IG) para el tratamiento con los complejos conjugados**

El índice de germinación más alto es de 81,6% que corresponde a  $\epsilon$ -PL+OQ en conjunto con Ga (J) para la concentración de 125 mg L<sup>-1</sup>, mientras que el porcentaje más bajo es para las concentraciones de 125 y 250 mg L<sup>-1</sup> que corresponde al tratamiento  $\epsilon$ -PL+OQ en conjunto con F (M) con 4,65%. Es importante nombrar que el porcentaje nulo es para la concentración de los 500 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 7).

- **Análisis estadístico del índice de porcentaje de germinación residual normalizado (IGN) para complejos de inclusión y complejos conjugados**

Los valores de IGN indican el grado de toxicidad de los tratamientos analizados. El análisis estadístico solo se realizó para las muestras que presentaban un porcentaje de germinación mayor a cero en relación a las tres concentraciones (125, 250 y 500 mg L<sup>-1</sup>), tanto para los complejos de inclusión (Experimento 1) como para los complejos conjugados (Experimento 2). Para comprender y optimizar la relación entre las variables evaluadas se ajustaron a un modelo lineal general de análisis de la varianza. En la (Tabla 8) se observa que para el análisis Testigo y Tratamiento\*Concentración (Experimento\*) el p-valor es (<0.001), mientras que para Experimento\*Testigo no se encontró diferencias estadísticas (p>0,05). Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación, para el análisis de variancia elegimos como variable Tratamiento\*Concentración (Experimento\*).

Tabla 8. Cuadrado medio (CM) para índice de germinación normalizado (IGN) para semillas de *Lactuca sativa* L.

F.V.	Gl	CM	P-valor
Experimento	1	0,38	0,005771
Testigo	1	0,92	0,0000051
Exper*testigo	1	0,15	0,072396 <sup>ns</sup>
Tratam*Concen (Exper*)	10	0,21	0,000105
Error	46	0,045	

\*Diferencias altamente significativas ns: no significativo

El tratamiento que solo tiene OQ presenta un valor IGN=0 (Bagur-González et al. 2011) que representa baja toxicidad para las tres concentraciones utilizadas (125, 250 y 500 mg L<sup>-1</sup>) a diferencias a los demás tratamientos con complejos de inclusión en combinación con los compuestos bioactivos estudiados, como se indica en la Figura 16.

El caso de los tratamientos con los complejos de inclusión A7 (S+SH) y B7 (E+SH), a la más baja concentración (125 mg L<sup>-1</sup>), presentan un IGN de 0 y -0,1 lo que indican que tiene una toxicidad baja al contrario a los mismos tratamientos en concentraciones altas (250 y 500 mg L<sup>-1</sup>), para A7 (IGN= -0,8 hasta -1,2 altamente toxico) y para B7 (IGN= -0,3 hasta -1,2 altamente toxico). A concentración baja (125 mg L<sup>-1</sup>) los tratamientos B1(S+SY+OQ) y B2(S+F+OQ) indica valores de IGN muy tóxicos (-0,6 y -1,1; -0,2 y -0,5) (Bagur-González et al. 2011).

En el caso de los tratamientos con los complejos conjugados y en combinación con todos los compuestos bioactivos (ácido gálico, ácido abiético y ácido ferúlico), a concentración de 500 mg L<sup>-1</sup> la eliminamos como variable del análisis de variancia porque la germinación de las semillas de *L. sativa* ha resultado nula.

En la figura 17 para los tratamientos con complejos conjugados (K) (E-PI+OQ+Ga) y (M) (E-PI+OQ+F) y a concentración de 125 mg L<sup>-1</sup>, el valor del (IGN= -0.25 y -0.1) representa baja toxicidad por el contrario al tratamiento (J) (E-PI+OQ+Aa) que presenta un valor (IGN= -0.47) representa toxicidad moderada.

Solo el tratamiento K (E-PI+OQ+Ga) a concentración más alta de 250 mg L<sup>-1</sup> presento un IGN= 0.25, lo que indica crecimiento de la radícula u hormesis (índice > 0) (Bagur-González et al. 2011).

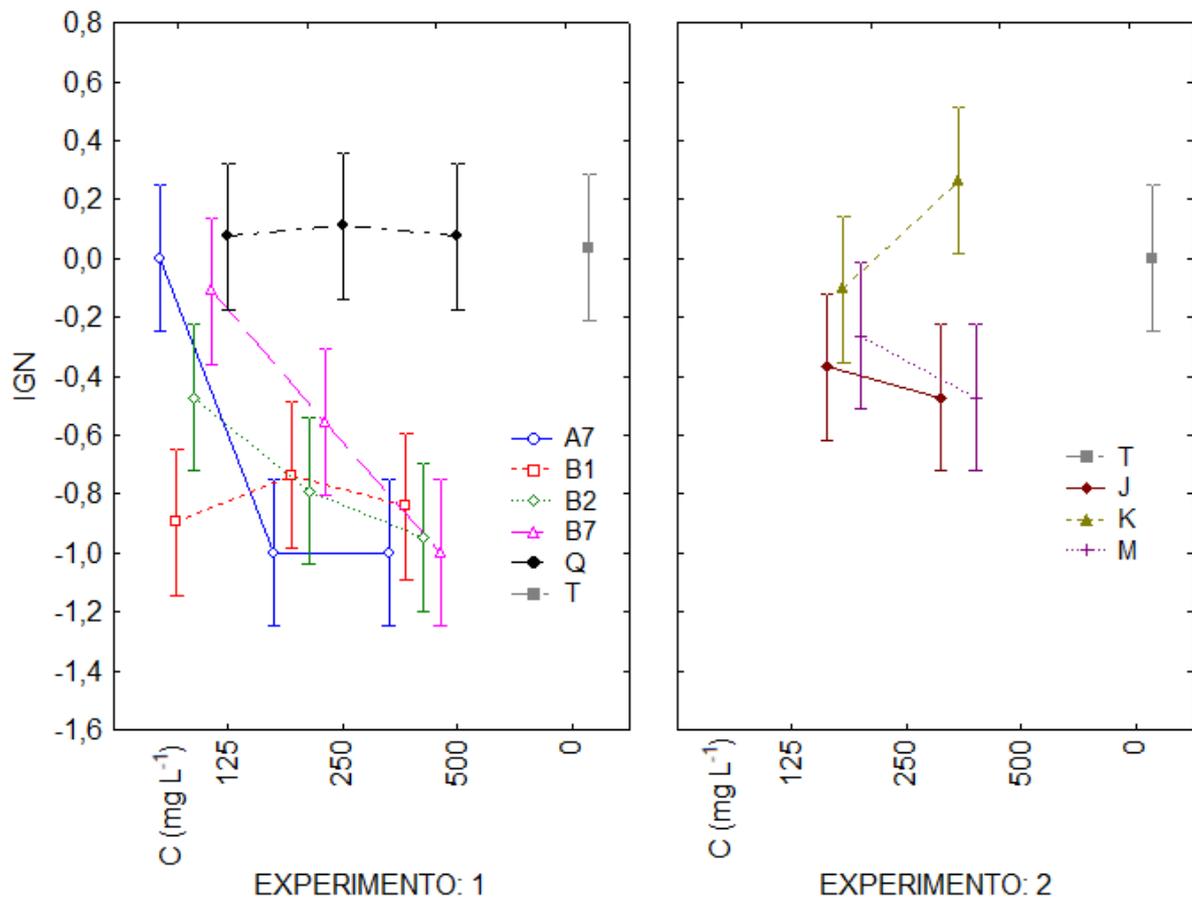


Figura 16. Comparación del índice de germinación normalizado a diferentes concentraciones para los tratamientos con complejos de inclusión (Experimento 1) y complejos conjugados (Experimento 2).

## 5. DISCUSIÓN

Las semillas de *Lactuca sativa* L. mostraron una gran sensibilidad a los complejos de inclusión en base a líquidos iónicos (DES) con un porcentaje de germinación nulo. Los resultados similares indica Radošević' (2015) cuando trabaja con líquidos iónicos profundos (DES) basados en cloruro de colina con glucosa, glicerol y ácido oxálico sobre semillas de trigo, demostrando la alta y moderada fitotoxicidad de las tres mezclas, siendo el compuesto por ácido oxálico el más nocivo. La fitotoxicidad se ha relacionado con el estrés oxidativo debido a la perturbación de las actividades de las enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa y guayacol peroxidasa. Por otra parte, Wena (2015) evaluó los efectos tóxicos en diferentes organismos vivos como la germinación de *Allium sativum*



(ajo) y encontró que el tratamiento que tenía (DES) basado en cloruro de colina ejercía una mayor inhibición al tratamiento que contenía (DES) basado en acetato de colina, por lo tanto, determinaron que por la vida corta y desintegración que tuvo las raíces de los ajos pueden ser tóxicos. Por el contrario, en nuestro estudio se obtuvo germinación nula utilizando (DES) basados en cloruro de colina y glicerol. En la evaluación de la germinación en ajos, aunque al principio el ChCl como el glicerol parecían inhibir fuertemente el crecimiento de las raíces de *A. sativum*, su incorporación al (DES) (cloruro de colina/ glicerol) desencadenó que la longitud de la raíz aumentara de forma normal (Wena et al., 2015). El bioensayo de germinación de semillas con *Lactuca sativa* L. utilizando los (DES) demuestra una nula a baja germinación que representa un importante aspecto sobre la toxicidad de los líquidos iónicos profundos (DES) al tener el componente principal el cloruro de colina, aunque sea considerado como eco-amigable. Otro estudio relacionado demostró que la toxicidad de diez diferentes sales de colina varía en función del anión (Ventura et al., 2014). Si bien la mayoría de estos compuestos se pueden clasificar como "prácticamente inofensivos", su eco-toxicidad es en realidad más alta que la de los solventes orgánicos comunes como el cloroformo o el diclorometano, y algunos tienen toxicidades comparables o incluso mayores que las de los plaguicidas de referencia, como la atrazina (Ventura et al., 2014), caso que pueden ser utilizados como antifúngicos (Patente con ref. P201731489).

Los tratamientos que contiene solo oligómeros de quitosano tuvieron una mejor respuesta tanto para el porcentaje de germinación en relación al testigo y a los demás tratamientos. El índice de toxicidad indicó que tiene una baja toxicidad con relación a los demás tratamientos, evidenciando así el efecto bioestimulante que tienen los oligómeros de quitosano de bajo peso molecular sobre la germinación de las semillas de *L. sativa*. Peniche (2006), confirmó que el quitosano se comporta como un bioestimulante en el tratamiento a la semilla de tomate, al mejorar la germinación y lograrse posturas de mayor altura, grosor de tallo y masa seca. La aplicación de quitosano a bajas concentraciones ( $150 \text{ mg ml}^{-1}$ ) en la germinación de rábano benefició promoviendo el mayor crecimiento de raíz en el cultivo, superando al testigo (agua) con un 39.7%. La aplicación de quitosano demuestra efecto positivo en el crecimiento de la planta tanto en la estimulación de la germinación de semillas como en el crecimiento de sus partes como raíces, pamanos y hojas (Bhaskara et al., 1999; Peniche, 2006).

Al igual que el tratamiento de oligómeros de quitosano, el tratamiento con esteviósido presenta características similares en la germinación de las semillas de *L. sativa* y que tienen relación con los resultados de baja toxicidad para el caso de la menor concentración. Sin embargo, este tratamiento con compuesto esteviósido no supera el porcentaje de germinación del control, ni del tratamiento con oligómeros de quitosano lo que puede deberse a una alta concentración utilizada en este estudio ( $125, 250$  y  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ). Sorol de Amarilla (1996) evaluó el efecto del esteviol y esteviosido en germinación de semillas de *Petunia hybrida* Vilm., y afirma que se puede obtener un buen porcentaje de



germinación siempre y cuando se aplique concentraciones entre 1- 100 mg L<sup>-1</sup>, aunque si se aplicara 1 mg L<sup>-1</sup> se pueden registrar porcentajes de germinación similares a cuando se usa ácido giberélico utilizando la misma concentración. Una de las principales causas de que no se haya presentado porcentajes altos de germinación es debido a que el estevioso tiene a comportarse como ácido giberélico y por las altas concentraciones utilizadas, esto es corroborado por Deaquiz y Burgos (2013) en su evaluación de aplicación de giberelinas sobre la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Dosis de 125, 250 y 500 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico presentaron porcentajes de germinación bajos (38.6, 37.4 y 33.38 % respectivamente), en comparación con el testigo se obtuvo el mayor porcentaje con 56.7 %, atribuido al efecto inhibitorio del ácido giberélico en la hidrólisis de carbohidratos.

Los porcentajes de germinación de las semillas empleadas en este estudio demuestran que los tratamientos con complejos conjugados en base a  $\epsilon$ -polilisina en combinación con los oligómeros de quitosano tienen un comportamiento similar a los tratamientos en solución hidroalcohólica, la concentración alta inhibe la germinación. Aunque la tasa de germinación de las semillas es baja (125 y 250 mg L<sup>-1</sup>) o nula (500 mg L<sup>-1</sup>) en la literatura la mayoría de los trabajos demuestra un excelente efecto en el control de enfermedades y una protección microbiana muy significativa al emplear sistemas mixtos con polilisina, hidroxipropil celulosa, pectina, proteína del suero y quitosano (Cui et al., 2000). Utilizando solo  $\epsilon$ -polilisina las semillas de *L. sativa* no germinaron para ninguna concentración empleada, en cambio el complejo conjugado  $\epsilon$ -polilisina con oligómeros de quitosano sin compuestos bioactivos a mínima concentración (125 mg L<sup>-1</sup>) presenta germinación, esto confirmando el efecto bioestimulador del quitosano (Peniche, 2006),

En este trabajo se presentan datos sobre germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. en el laboratorio del cual se examinan los porcentajes y los índices de germinación, así como el efecto de dos tipos de composite utilizados, complejos de inclusión y complejos conjugados, demostrado el efecto inhibitorio en la germinación y el efecto bioestimulador de la germinación al utilizar los productos por separado especial cuando se trabaja con quitosano y estevioso.



## 6. CONCLUSIONES

La utilización de complejos conjugados y de inclusión para mejorar la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L se puede ver afectado por el tipo de compuestos químicos que se estén utilizando, ya que algunos tienen el poder de mejorar la germinación mientras que otros la inhibe. El caso de nuestro estudio demuestra para los complejos de inclusión que la mayoría de los tratamientos no generó un buen porcentaje de germinación, mientras que por el contrario, el tratamiento que solo está formado por oligómeros de quitosano, y el tratamiento con solo esteviósido sin ninguna combinación, presentaron porcentajes de germinación relativa positivos. Cabe destacar que los oligómeros de quitosano en la concentración más baja ( $125 \text{ mg L}^{-1}$ ), proporciona porcentaje de germinación relativa similar al testigo (agua) (GRS 107,41 y 103,70 %, respectivamente). Además de esto el tratamiento que solo contenía oligómeros de quitosano en la evaluación de los complejos de inclusión arrojó el mejor resultado para la germinación, para las tres concentraciones empleadas ( $125$ ,  $250$  y  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ). Podemos afirmar que todos los tratamientos que tienen como constituyente líquidos iónicos profundos (DES) no germinaron.

Por otra parte, los complejos conjugados presentan un mejor desempeño en los porcentajes de germinación relativa en semillas de *Lactuca sativa* L. pero solo a las concentraciones de  $125$  y  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , ya que a concentraciones de  $500 \text{ mg ml}^{-1}$  no hubo germinación para ninguno de los tratamientos. Este fenómeno puede ser explicado de manera sencilla, mientras que el tratamiento que solo contiene  $\epsilon$ -polilisina no presentó germinación, los tratamientos que contenían mezclas de  $\epsilon$ -polilisina con oligómeros de quitosano tuvieron buenos porcentajes relativos de germinación, demostrando el efecto bioestimulador del quitosano.

Una de las posibles causas para que se produzca la inhibición de las semillas de *Lactuca sativa* L. es la toxicidad. Por ello evaluamos el índice de germinación normalizado (IGN), ya que este es capaz de medir el grado de toxicidad para los composites. Este índice arrojó valores importantes con los cuales se pudo definir que el tratamiento que solo tenía oligómeros de quitosano a las tres concentraciones presentó el mejor IGN con relación a los demás tratamientos, pero es igual al testigo (agua) (IGN=0). Esto quiere decir que los oligómeros de quitosano no tienen toxicidad que impida el desarrollo de las semillas. Un comportamiento similar lo tiene el tratamiento que contiene solo esteviósido, pero solo a concentración de  $125 \text{ mg L}^{-1}$  ya que si se aumentan las concentraciones a  $250$  y  $500 \text{ mg L}^{-1}$  el esteviósido pasa a ser altamente tóxico (IGN -0,8 y -1,2), al igual que el compuesto formado por esteviósido con oligómeros de quitosano y ácido ferúlico (S+OQ+F) (B2) (IGN -0,5 y -1,2).



En cuanto a polifenoles se destaca con el valor más alto el complejo de inclusión que contiene esteviósido con oligómeros de quitosano y ácido gálico (S+OQ+Ga) (26,2 mg Eq. ácido gálico/100 ml), mientras que las muestras que están constituidas por líquidos iónicos profundos y solución hidroalcohólica presentan valores menores (1,87-4,67 mg Eq. ácido gálico/100 ml). Para los complejos conjugados el tratamiento que contiene  $\epsilon$ -polilisina con oligómeros de quitosano y ácido abiético ( $\epsilon$ -PI+OQ+Aa) (J) presentan un alto contenido de polifenoles (29,38 mg Eq. ácido gálico/100 ml). Todo esto correlacionado con los resultados obtenidos en el bioensayo de germinación.

El porcentaje de inhibición radical (DPPH) para los complejos de inclusión ratifica los resultados dados por el porcentaje de polifenoles. El mayor porcentaje de inhibición de (DPPH) es para esteviósido con oligómeros de quitosano y ácido gálico (S+OQ+Ga) con 79.81%. Para los complejos conjugados el mejor porcentaje fue para la  $\epsilon$ -polilisina con oligómeros de quitosano y ácido ferúlico ( $\epsilon$ -PI+OQ+F) (M) con el 80.88%.

Los complejos conjugados también se ven afectados por las concentraciones altas, los tratamientos que contienen  $\epsilon$ -polilisina con oligómeros de quitosano ya sea con ácido gálico ( $\epsilon$ -PI+OQ+Ga) (K) o ácido abiético ( $\epsilon$ -PI+OQ+Aa) (J) a concentraciones bajas sus índices de germinación normalizada (IGN) sugieren que tiene baja toxicidad (IGN= -0.25 y IGN= -0.47, respectivamente) y esto es corroborado por los demás índices como el (%IG) ((J) (59,3%) y (K) (81,6%)) y el (%CRR) ((J) (93,88%) y (K) (91,16%)).

## 7. AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Carolina por la beca otorgada y financiada por Banco Santander. A los Profesores de la Universidad de Valladolid, Jesús Martín Gil, Salvador Hernández Navarro, Mercedes Sánchez Báscones, Adriana Correa Guimares y Luis Manuel Navas Gracia del Departamento de Ingeniería Agrícola por el espacio y apoyo en la realización de los experimentos; y a Petruta Mihaela Matei, Iosody Silva Castro, Valentín Pando, Pablo Martín Ramos y Juan Manuel Antolín por el apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo



## 8. REFERENCIAS

1. Bagur-González M.G., Estepa-Molina C., Martín-Peinado, F. y Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *J. Soil. Sediment.* 11, 281-289.
2. Bhaskara, R., Arul, J., Angers, P., Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agriculture and food Chemistry.* Vol. 3. Numero 47. Pág. 1208-1216.
3. Biswas, A., Shogren, R., Stevenson, D., Willett, J., y Bhowmik, PK (2006). Líquidos iónicos como disolventes para biopolímeros: Acilación de almidón y proteína zeína. *Polímeros de carbohidratos* 66, 546-550.
4. Brandle J.E., Richman A., Swanson A. y Chapman B. (2002). Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*. A resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Mol. Biol.* 50, 613-622
5. Carbonell J., Barba F., Esteve M., Frigola A. (2013). High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia Rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 18: 48-56.
6. Chheda, A. H., & Vernekar, M. R. (2014). A natural preservative  $\epsilon$ -poly-L-lysine: fermentative production and applications in food industry. *International Food Research Journal*, 22(1), 23-30.
7. Cuevas, J. G., & Arroyo, M. T. (1999). Ausencia de banco de semillas persistente en *Nothofagus pumilio* (Fagaceae) en Tierra del Fuego, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72, 73-82.
8. Cui, Jing Hao; Goh, Juhn Su; Kim, Pyung Hyun; Choi, Suk Ho and Lee Beom Jin. (2000). Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-Lupo-Pasin, Bryshila et al. 147 lysine microparticles. *International Journal of Pharmaceutics.* 210(1-2):51-59.
9. Deaquiz Oyola, Y. & Burgos Avila, Y. (2013). Efecto de la aplicación de giberelinas (GA3) sobre germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad santa cruz. *Conexión Agropecuaria JDC.* 3: 29-36
10. Delgado, L., Torres, M. A., Pérez, C. A., & Calero, Á. (2009). Extracción y caracterización de los glicósidos de la *Stevia Rebaudiana*. *Ingenium*, 4(8), 52-68.



11. Freepons D. (1997). Enhacing food production with Chitosan seed-coating technology. En M. Goossen (Ed.) *Aplicaciones de Chitin and Chitosan*, Technimic Publishing Company. Lancaster, Pennsylvania-USA. Cap 8.
12. Goyal., S., Samsher, K., R.K. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetner: a review. *Internatioanl Journal of Food Sciences and Nrutrition*, 61 (1), 1-10.
13. Hirano A., Nagano N. (1989). Effects of Chitosan, pectic acid, lysoyme, and Chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultrual and Biological Chemistry* 11: 3065-3066.
14. Jarma A., Espitia M., Fischer G. (2010). Síntesis de esteviosidos en estevia (*Stevia rebaudiana* Bert). *Acta Biol. Colomb.* 15 (1), 263-268
15. Martínez, E. M. G., Segovia, I. F., & López, A. F. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu .
16. Martinez, J. (2011) tesis: Obtención de oligómero de quitosan y su evaluación como posibles promotores de crecimiento en tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo estrés salino. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo- Mexico.2011.
17. Matei, P.M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Báscones, M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Navas-Gracia, L.M., Rufino, C.A., Ramos-Sánchez, M.C., Martín-Gil, J. (2015). Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. *Int. J. Polym. Sci.*, 2015, 1-11.
18. Moreno, F., Plaza, G. A., & Magnitskiy, S. V. (2006). Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agronomía Colombiana*, 24(2), 290-295.
19. Pandey, A. K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine. *Process Biochemistry*, 49(3), 496-505.
20. Patente Número de solicitud P201731489 (Fecha de recepción: 28 diciembre 2017) titulada: "Complejo de inclusión para mejorar la biodisponibilidad de compuestos biológicamente activos no hidrosolubles".
21. Peniche, C. (2006). Estudios de quitina y quitosana. Tesis de doctorado en ciencias. Universidad de la Habana, Facultad de Química. La Habana.
22. Radošević, K., Bubalo, M. C., Srček, V. G., Grgas, D., Dragičević, T. L., & Redovniković, I. R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and environmental safety*, 112, 46-53.



23. Rodríguez Romero, A. J., Robles Salazar, C. A., Ruíz Picos, R. A., Lopez Lopez, E., Sedeño Díaz, J. E., & Rodriguez Dorantes, A. (2014). Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitoreo de la calidad del agua del río Chalma. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(3), 307-316.
24. Rozenberg, M., & Shoham, G. (2007). FTIR spectra of solid poly-L-lysine in the stretching NH mode range. *Biophysical chemistry*, 125(1), 166-171.
25. Ruedas, M., Valverde, T., & Argüero, S. C. (2000). Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimamma* (Cactaceae) bajo diferentes condiciones ambientales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (66), 25-35.
26. Sanches A.M. (2015). Quito oligosacáridos bifuncionales: relación entre características químico-físicas y propiedades biológicas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Física II (Físico Química Farmacéutica), Universidad Complutense de Madrid. Madrid- España, 55 p.
27. Sorol de Amarilla C. (1996). Efecto del esteviósido y del esteviol en germinación de semillas de *Petunia hybrida* Vilm. (Solanaceae). Centro de investigación y desarrollo Tecnológico. Facultad de ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Argentina. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral* 27 (1): 49-53.
28. Sun T., Zhou D., Xie J., Mao F. 2007. Preparación de oligómeros de quitosano y su actividad antioxidante. *UE. Comida. Res. Technol.* 225: 451-456.
29. Toledo Marante, F. J. (2016). Métodos químicos para medir la actividad antioxidante de extractos brutos, fracciones cromatográficas enriquecidas y polifenoles puros obtenidos a partir de líquenes. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Química, Gran Canaria, España. (1): 32
30. Ventura, S.P.M., e Silva, F.A., Gonçalves, A.M.M., Pereira, J.L., Gonçalves, F., Coutinho, J.A.P., (2014). Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Environ. Saf.* 102, 48–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.003>
31. Wen, Q., Chen, J. X., Tang, Y. L., Wang, J., & Yang, Z. (2015). Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere*, 132, 63-69.
32. Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174.
33. Ziani K., Úrsula B., Maté J. (2010)- Application of biocide coating based on Chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection* 29: 853-859.