



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA E INGENIERÍA
AGROALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

TESIS DOCTORAL

**NANOTRANSPORTADORES CON APLICACIONES
EN INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS**

Presentada por Alberto Santiago Aliste para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Pablo Martín Ramos

TESIS DOCTORAL

NANOTRANSPORTADORES CON APLICACIONES EN INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS

Memoria presentada por

Alberto Santiago Aliste

para optar el Grado de Doctor por la Universidad de Valladolid

Director:

Dr. D. Pablo Martín Ramos

Tutor Académico:

Dr. D. Jesús Martín Gil

Palencia, 11 de diciembre de 2023

Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias
Departamento de Ingeniería Agroforestal
Universidad de Valladolid



Universidad de Valladolid

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar por expresar mi agradecimiento a mi director, Pablo Martín Ramos, y a mi tutor académico, Jesús Martín Gil. Sin ellos, esta Tesis no hubiera sido posible.

Jesús, siempre te estaré agradecido por haberme propuesto realizar la Tesis Doctoral con vosotros. Me alegro enormemente de haber aceptado la oferta. Gracias por confiar en mí desde el principio, por estar ahí siempre, en los momentos buenos y en los no tan buenos. Gracias por animarme a comenzar esta aventura y por haberme guiado, llevándome a buen puerto.

Pablo, quiero agradecerte tu dedicación y paciencia durante estos años. Valoro tu esfuerzo, tu pasión por enseñar y, sobre todo, tu impecable profesionalidad (y perfeccionismo). Para mí eres un ejemplo a seguir. Gracias por enseñarme tanto. Siempre te estaré agradecido por lo que has hecho por mí.

Eva, te agradezco de corazón tu compañerismo, tu continuo apoyo y tu ayuda durante estos años. Eres una gran profesional y una grandísima persona.

A mi padre, por inculcarme desde pequeño el valor del trabajo y el esfuerzo.

A mi madre, por su presencia constante en mi vida y por brindarme su respaldo en cada elección que he hecho.

A mi hermana, por su consejo en todas mis decisiones y su apoyo incondicional en cada una de ellas.

A mi tío Manuel, por enseñarme los valores adecuados para dirigir mi vida.

A mis sobrinas, Leire e Irene, por regalarme muchos de los mejores momentos de mi vida.

A toda mi familia.

RESUMEN

El control de enfermedades en agricultura es un reto que cada vez mayor, por la aparición de resistencias y la prohibición de productos fitosanitarios, con importantes repercusiones tanto para los agricultores como para el medio ambiente. Esta Tesis Doctoral se centra en la búsqueda de alternativas para el control integrado de fitopatógenos basadas en la nanotecnología, como medio para la optimización de otros métodos de gestión integrada. Dado que los extractos naturales generalmente presentan problemas de labilidad, solubilidad y/o falta de especificidad, se propone el uso de nanotransportadores para su vehiculización y liberación controlada. La mejora de eficacia de estos productos bioactivos de origen natural con propiedades antimicrobianas al ser encapsulados en los nanotransportadores desarrollados, basados en oligómeros de quitosano y anhídrido metacrílico como agente de entrecruzamiento (en conjunción con lignina, nitruro de carbono gráfico y/o hidroxiapatito), ha sido evaluada *in vitro*, *ex situ*, y en campo. El enfoque seleccionado ha demostrado ser adecuado para el control de enfermedades de la madera de la vid, tanto para la reducción de necrosis vasculares vía endoterapia como para la protección en heridas de poda vía aplicación directa, y de enfermedades postcosecha en frutas mediante recubrimiento superficial. La encapsulación de los agentes terapéuticos ha conducido a concentraciones mínimas inhibitorias inferiores a las de los extractos sin encapsular en todos los casos, comparables a las de fungicidas de síntesis. Adicionalmente, la incorporación del nitruro de carbono a los nanotransportadores permite su multifuncionalidad, ampliando su ámbito de aplicación a la remediación ambiental.

Palabras clave: encapsulación, extractos, hidroxiapatito, nanotransportadores, nitruro de carbono, productos naturales bioactivos, quitosano, vid, frutas.

ABSTRACT

Disease control in agriculture is a growing challenge, due to the appearance of resistances and the prohibition of phytosanitary products, with important repercussions for both farmers and the environment. This PhD Thesis focuses on the search for alternatives for the integrated control of phytopathogens based on nanotechnology, as a means for the optimization of other integrated management methods. Since natural extracts generally present problems of lability, solubility, and/or lack of specificity, the use of nanocarriers for their delivery and controlled release is proposed. The improved efficacy of these bioactive products of natural origin with antimicrobial properties when encapsulated in the developed nanocarriers, based on chitosan oligomers and methacrylic anhydride as a crosslinking agent (in conjunction with lignin, graphitic carbon nitride, and/or hydroxyapatite), has been evaluated *in vitro*, *ex-situ*, and in the field. The selected approach has proven to be suitable for the control of grapevine wood diseases, both for the reduction of vascular necrosis via endotherapy and for the protection of pruning wounds via direct application, and of post-harvest diseases in fruit via surface coating. Encapsulation of therapeutic agents has led to lower inhibitory concentrations than those of unencapsulated extracts in all cases, comparable to those of synthetic fungicides. Additionally, the incorporation of carbon nitride into the nanocarriers allows their multifunctionality, extending their scope of application to environmental remediation.

Keywords: encapsulation, extracts, hydroxyapatite, nanocarriers, carbon nitride, bioactive natural products, chitosan, grapevine, fruits.

INFORME SOBRE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

Esta Tesis doctoral es un compendio de tres artículos publicados en revistas científicas indexadas en Web of Science (WOS) – Journal Citation Reports (JCR), dos de ellas en primer cuartil (Q1) y una en segundo cuartil (Q2).

Las referencias completas de los artículos y patentes asociados a la Tesis Doctoral son:

1. Eva Sánchez Hernández; Natalia Langa Lomba; Vicente González García; José Casanova Gascón; Jesús Martín Gil; Alberto Santiago Aliste; Sergio Torres Sánchez; Pablo Martín Ramos. “Lignin-chitosan nanocarriers for the delivery of bioactive natural products against wood-decay phytopathogens” *Agronomy*, 2022, 12(2), 461; <https://doi.org/10.3390/agronomy12020461>. Q1 JCR (Science Edition – AGRONOMY), JIF₂₀₂₂ = 3,7.
2. Alberto Santiago Aliste; Eva Sánchez Hernández; Natalia Langa Lomba; Vicente González García; José Casanova Gascón; Jesús Martín Gil; Pablo Martín Ramos. “Multifunctional nanocarriers based on chitosan oligomers and graphitic carbon nitride assembly”. *Materials* 2022; 15(24), 8981; <https://doi.org/10.3390/ma15248981>; Q2 JCR (Science Edition – METALLURGY & METALLURGICAL ENGINEERING), JIF₂₀₂₂ = 3,4.
3. Alberto Santiago Aliste; Eva Sánchez Hernández; Laura Buzón Durán; José Luis Marcos Robles; Jesús Martín Gil; Pablo Martín Ramos. “*Uncaria tomentosa*-loaded chitosan oligomers–hydroxyapatite–carbon nitride nanocarriers for postharvest fruit protection”. *Agronomy*, 2023, 13(9), 2189; <https://doi.org/10.3390/agronomy13092189>. Q1 JCR (Science Edition – AGRONOMY), JIF₂₀₂₂ = 3,7.

Las patentes asociadas, una con solicitud PCT (Tratado de Cooperación en materia de Patentes), se recogen en el Anejo I.

- Eva Sánchez Hernández; Alberto Santiago Aliste; Jesús Martín Gil; Pablo Martín Ramos. “Nanomaterial basado en el autoensamblaje de g-C₃N₄ y oligómeros de quitosano, proceso de obtención y usos”. Patente española con número de solicitud P202230668, presentada el 20 de julio de 2022. Ampliada con solicitud internacional PCT/ES2023/070409.
- Eva Sánchez Hernández; Alberto Santiago Aliste; Jesús Martín Gil; Pablo Martín Ramos. “Nanomaterial encapsulante formado por g-C₃N₄ y oligómeros de quitosano enlazados a hidroxapatita, proceso de obtención y usos”. Patente española con número de solicitud P202330435, presentada el 31 de mayo de 2023.

Otros artículos en revistas indexadas, co-autorados durante el desarrollo de la Tesis Doctoral, relacionados con los anteriores, pero que no forman parte del cuerpo de la Tesis Doctoral por razones de coherencia temática, son:

- Eva Sánchez Hernández; Pablo Martín Ramos; Jesús Martín Gil; Alberto Santiago Aliste; Salvador Hernández Navarro; Rui Oliveira; Vicente González García. B “Bark extract of *Uncaria tomentosa* L. for the control of strawberry phytopathogens” *Horticulturae*, 2022, 8(8), 672; <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080672>; Q1. JIF₂₀₂₂ = 3,1.
- Alberto Santiago Aliste; Eva Sánchez Hernández; Celia Andrés Juan; Pedro Chamorro Posada; Guillermo Antorrena; Jesús Martín Gil; Pablo Martín Ramos. “F,O,S-codoped graphitic carbon nitride as an efficient photocatalyst for the synthesis of benzoxazoles and benzimidazoles”. *Catalysts*, 2023 13(2), 385; <https://doi.org/10.3390/catal13020385>; Q2. JIF₂₀₂₂ = 3,9.

El artículo nº 1 ha sido seleccionado como “*Editor’s Choice*”. El artículo nº 2 ha sido seleccionado como “*Most notable article*” de la revista *Materials* en el periodo noviembre 2022-enero 2023 en la categoría de biomateriales. El artículo de *Horticulturae* ha sido destacado como ‘*Feature paper*’ y seleccionado como ‘*Editor’s choice*’ en el periodo Julio-Diciembre 2022 en la categoría ‘*Postharvest Biology, Quality, Safety, and Technology*’.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Motivación.....	3
1.1.1. <i>Potencial de la nanotecnología en agricultura</i>	3
1.2. Estado del arte de los nanotransportadores en agricultura.....	4
1.2.1. <i>Nanotransportadores basados en materiales inorgánicos</i>	4
1.2.2. <i>Nanotransportadores basados en polímeros sintéticos</i>	5
1.2.3. <i>Nanotransportadores lipídicos: nanoemulsiones, nanoliposomas y nanopartículas lipídicas sólidas</i>	5
1.2.4. <i>Nanotransportadores biopoliméricos</i>	5
1.3. Objetivos de la Tesis Doctoral.....	7
1.3.1. <i>Hipótesis de trabajo</i>	7
1.3.2. <i>Objetivos generales</i>	7
1.3.3. <i>Objetivos específicos</i>	7
1.4. Justificación de la unidad temática de los artículos.....	7
1.5. Metodología general	8
1.6. Bibliografía	10
2. Compendio de publicaciones	15
2.1. Artículo 1: Lignin–chitosan nanocarriers for the delivery of bioactive natural products against wood-decay phytopathogens.....	17
2.2. Artículo 2: Multifunctional nanocarriers based on chitosan oligomers and graphitic carbon nitride assembly.....	39
2.3. Artículo 3: <i>Uncaria tomentosa</i> -loaded chitosan oligomers–hydroxyapatite–carbon nitride nanocarriers for postharvest fruit protection	61
3. Conclusiones.....	101
Anejo I: Patentes	105

1. Introducción

1.1. Motivación

1.1.1. *Potencial de la nanotecnología en agricultura*

En agricultura, los productos fitosanitarios son utilizados por los agricultores para proteger los cultivos de diversas amenazas que pueden reducir su rendimiento o calidad. El uso de estos compuestos químicos es esencial para la producción de alimentos, a fin de mantener el rendimiento de las cosechas, y contribuye a la seguridad alimentaria, al asegurar la disponibilidad de alimentos para una población mundial creciente [1]. No obstante, se estima que más del 90% de estos productos acaba perdiéndose por diferentes vías, con consecuencias perjudiciales para el medio ambiente, provocando, entre otros efectos, contaminación de acuíferos, acidificación del suelo, y posibles residuos en alimentos tratados [2].

Con el objetivo de hacer frente a esos problemas, es preciso desarrollar nuevas técnicas y enfoques. El principal es la agricultura ecológica, que permite un uso muy reducido de algunos de estos productos y —en algunos casos— los prohíbe completamente. Sin embargo, también presenta ciertas limitaciones en un contexto de cambio climático y aumento de la demanda de alimentos, pues habitualmente conduce a rendimientos por hectárea más bajos que los de la agricultura convencional.

Para aumentar la eficiencia y resiliencia de la agricultura, tanto convencional como ecológica, en el campo de la investigación emerge otra vía: el uso de la nanotecnología [3] y, en concreto, de los nanotransportadores o *nanocarriers*. Estos nanomateriales se vienen empleando en diferentes campos, incluyendo la medicina y farmacología, la cosmética, la tecnología medioambiental, la electrónica y optoelectrónica, y, más recientemente, en la agricultura y la industria agroalimentaria [4,5].

Entre las ventajas asociadas al uso de los nanotransportadores en agricultura, destacan las siguientes:

- Gracias a su versatilidad, pueden ser diseñados para transportar una amplia variedad de sustancias activas [6].
- Tienen la capacidad de mejorar la solubilidad y estabilidad de los productos encapsulados, lo que se traduce en una mayor eficacia y una reducción de la cantidad necesaria para conseguir el efecto deseado, con importantes ahorros en términos de costes de producción [6,7]. En el caso de productos naturales, es de especial utilidad en el caso de aceites esenciales [4].
- Tienen propiedades de liberación selectiva y focalizada (dirigida) de los agroquímicos encapsulados, sean nutrientes o pesticidas [6,8].
- Pueden ser biodegradables y poseer una alta biocompatibilidad [9].
- Tienen una gran superficie específica y una elevada porosidad, características clave para facilitar la interacción con sustratos biológicos y actuar como soportes [10].
- Evitan la degradación prematura de los agentes de protección (por ejemplo, frente a condiciones meteorológicas extremas), prolongando su vida útil y reduciendo la frecuencia de aplicación, y minimizan las pérdidas por lixiviación y volatilización [4,7,11-13].
- Reducen el impacto ambiental y la toxicidad de los productos encapsulados para los organismos no objetivo [7].
- Su pequeño tamaño mejora su absorción y hace que puedan llegar a cualquier parte de los tejidos de las plantas [5].

1.2. Estado del arte de los nanotransportadores en agricultura

Los artículos de revisión de Xiao *et al.* [5], Pinto *et al.* [14], Tao *et al.* [10] y Zhou *et al.* [15] ofrecen una visión exhaustiva y actualizada de los nanotransportadores sensibles a estímulos para el suministro de agroquímicos, pero a continuación se presenta un resumen.

Hasta la fecha, se han estudiado distintas tipologías de nanotransportadores para la protección de cultivos, como nanocápsulas, nanoesferas, micelas y nanogeles [7]. No obstante, el criterio habitual de clasificación se basa en su composición. Por una parte, se han ensayado con éxito materiales inorgánicos como la sílice mesoporosa, los nanomateriales basados en el carbono (por ejemplo, el óxido de grafeno), los minerales arcillosos, las estructuras metalorgánicas (MOF), el carbonato cálcico, el nitruro de boro, y los MXenos. Estos materiales ofrecen ventajas para la vehiculización de principios activos debido a su elevada superficie específica y porosidad, facilidad de funcionalización de su superficie y ajuste de su hidrofobicidad, y estructura del tamaño de los poros (para una liberación sostenida/controlada) [5]. Por otra parte, los nanotransportadores basados en polímeros sintéticos (por ejemplo, ácido poli-láctico, polidopamina y poliuretano), lípidos (nanoemulsiones, nanoliposomas, y nanopartículas lipídicas sólidas), ciclodextrinas, y biopolímeros (proteínas, lignina, y polisacáridos) son alternativas muy populares [16]. Estos últimos son especialmente atractivos por su naturaleza renovable, su comestibilidad, su sostenibilidad ambiental, y su flexibilidad de producción.

1.2.1. Nanotransportadores basados en materiales inorgánicos

Sílice mesoporosa: Sus principales ventajas son su elevada área superficial, gran volumen de poros, y alta densidad de grupos silanol. Se puede conseguir una liberación controlada del producto encapsulado mediante la modificación de los grupos superficiales con relativa facilidad [17,18].

Materiales basados en el carbono: Los nanotransportadores de carbono se caracterizan por tener una excelente capacidad de carga, su gran estabilidad, y bajo riesgo, tanto para el medio ambiente como para los organismos. Dentro de esta familia podemos encontrar las nanopartículas de carbono (CNP), los nanotubos de carbono (CNTs) y las nanopartículas de óxido de grafeno (GO). Estas últimas destacan por su capacidad de administración dirigida, elevada tasa de carga de producto, y gran solubilidad en agua [5].

Minerales arcillosos: Presentan ventajas en términos de gran estabilidad química y mecánica y alta superficie específica [19]. Son excelentes adsorbentes para compuestos iónicos y polares, con buena biocompatibilidad y baja biotoxicidad. La introducción de minerales arcillosos en las formulaciones de fitosanitarios confiere estabilidad y alarga la vida útil [20].

Estructuras metalorgánicas (MOF): Este tipo de materiales cristalinos poseen una porosidad extremadamente alta y elevadas áreas superficiales internas [21]. Adicionalmente, presentan cinéticas de liberación de ingredientes activos eficientes y pueden descomponerse en forma de nutrientes del suelo, minimizando la contaminación [22].

Carbonato cálcico: Como vehiculizador a la hora de administrar productos bioactivos, destaca debido a su baja toxicidad y lenta biodegradabilidad [23].

Nitruro de boro: Los sistemas de administración de agroquímicos basados en BN permiten una liberación sostenida a largo plazo de los productos encapsulados, y proporcionan boro y nitrógeno para el crecimiento de los cultivos [5].

MXenos: Estos nanomateriales 2D, creados por el grupo de Gogotsi [24], demuestran una excelente capacidad de adsorción y pueden absorber eficazmente moléculas pequeñas [25-27].

1.2.2. Nanotransportadores basados en polímeros sintéticos

Ácido poli-láctico: Es seguro para el ser humano, puede sintetizarse mediante diversos procesos, y dar lugar a partículas coloidales sólidas con tamaños micro- y nanométricos [28]. Permite tanto la adsorción superficial como la encapsulación de moléculas bioactivas hidrofílicas o lipofílicas [29].

Polidopamina: Presenta buena biocompatibilidad, reactividad química y estabilidad térmica [30]. Se adhiere fuertemente a las superficies de las plantas [31], gracias a su capacidad para formar enlaces químicos con los grupos funcionales de las superficies de las mismas. Esto puede mejorar la eficacia de los productos encapsulados, al reducir el lavado con la lluvia o el riego. Además, la polidopamina se puede modificar fácilmente para mejorar sus propiedades físicas y químicas.

Poliuretano: Tiene como principales ventajas su buena capacidad de control de la estructura y biocompatibilidad [32,33].

1.2.3. Nanotransportadores lipídicos: nanoemulsiones, nanoliposomas y nanopartículas lipídicas sólidas

Son una alternativa atractiva por su capacidad de encapsular compuestos hidrofílicos, hidrofóbicos y lipofílicos, su producción con materiales naturales de grado alimentario, y su adaptabilidad a la mayoría de los productos alimentarios sin efectos no-deseados [34,35]. Pueden mejorar la biodisponibilidad de los agentes antimicrobianos y prolongar su liberación en el alimento, mejorando la eficacia del envasado activo. En aplicaciones agrícolas, pueden alcanzar fácilmente la cutícula de los insectos.

Nanoemulsiones: Permiten el diseño de sistemas bi- o multicapa para la encapsulación de productos bioactivos de forma sencilla, adaptándose a la naturaleza del producto a encapsular (por ejemplo, la nanoemulsiones de agua en aceite son apropiadas para productos hidrofílicos, mientras que productos hidrofóbicos —como los aceites esenciales— deben ser encapsulados en nanoemulsiones de aceite en agua). Pueden combinarse con biopolímeros (proteínas y polisacáridos) [16].

Nanoliposomas: Poseen una bicapa lipídica, compuesta principalmente por fosfolípidos; la inclusión de esteroides en la membrana bicapa aumenta su estabilidad por la mejora de la fluidez. Hay muchas fuentes de grado alimentario adecuadas para su producción. Su principal ventaja es que permiten la co-encapsulación de productos hidrofóbicos e hidrofílicos. Son muy adecuados para la encapsulación de péptidos antimicrobianos [16].

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) y transportadores lipídicos nanoestructurados (NLCs): Pese a la similitud de las SLNs con las nanoemulsiones aceite/agua, el que la fase lipídica sea sólida disminuye la movilidad de los productos antimicrobianos encapsulados y permite su liberación controlada. Poseen alta estabilidad y eficiencia de encapsulación, y facilidad para producción a gran escala. No obstante, su capacidad de carga es reducida y el alto contenido en agua de sus dispersiones limita su aplicación, por lo que han sido superadas por los NLCs. La mezcla de lípidos en fase sólida y fase líquida en estos últimos permite una mayor capacidad de carga [7,16].

1.2.4. Nanotransportadores biopoliméricos

Las proteínas poseen una estructura espacial única para la carga de productos bioactivos, y buena biodegradabilidad y biocompatibilidad [36]. Las principales proteínas para la preparación de nanotransportadores biopoliméricos son las de la leche (por ejemplo, β -caseína, β -lactoglobulina, y proteína de suero), la zeína, la soja, y la gelatina. La caseína, al ser biocompatible, biodegradable, y no tóxica, es una opción atractiva para su uso en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Su capacidad de formar geles en presencia de iones calcio mejora la estabilidad de los

nanotransportadores y permite liberar los productos encapsulados de manera controlada [16]. La zeína, por su parte, también presenta baja toxicidad, buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, y costes de producción competitivos [37]. Su naturaleza hidrofóbica y solubilidad variable en diferentes condiciones permiten la fabricación sencilla de micro y nanopartículas [38]. Otras proteínas vegetales hidrofóbicas, como las procedentes de la soja, también tienen la capacidad de producir una liberación sostenida, y, cuando se modifican con grupos hidrofílicos, pueden formar micelas anfifílicas [39]. Respecto a la gelatina, es una opción atractiva para su uso en aplicaciones alimentarias debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad; y es susceptible de formar nanotransportadores por entrecruzamiento con quitosano o alginatos, aunque habitualmente se utiliza como matriz (por ejemplo, para albergar nanoliposomas), facilitando así la liberación controlada [16,40].

La lignina es otro polímero orgánico prometedor como materia prima para la síntesis de nanotransportadores, por su alta disponibilidad, bajo costo, biodegradabilidad y capacidad para ser modificada químicamente [41]. Posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas por la presencia de polifenoles en su estructura. Su naturaleza aromática es especialmente adecuada para la encapsulación de productos sensibles a la radiación UV, al neutralizar los radicales libres [14].

Por otra parte, polisacáridos como el almidón, la celulosa, el dextrano, la ciclodextrina, el pululano, el alginato, la pectina, el ácido hialurónico, o el quitosano también son comúnmente utilizados para nanoencapsulación. El almidón tiene una amplia disponibilidad y biodegradabilidad, no es tóxico, es capaz de formar nanopartículas porosas y puede ser modificado químicamente para mejorar su capacidad de carga y de liberación controlada [42]. La celulosa (y sus derivados, como la carboximetilcelulosa o la hidroximetilcelulosa) también se ha utilizado ampliamente en la producción de nanopartículas para la liberación controlada de fármacos y otros compuestos bioactivos, por ser biocompatible, biodegradable y no tóxica, abundante y renovable [16]. El dextrano también comparte ventajas importantes en la formulación de nanotransportadores eficientes y seguros, como biocompatibilidad, biodisponibilidad, capacidad de carga, estabilidad y propiedades de liberación controlada [3]. Por su parte, las β -ciclodextrinas (CD) son adecuadas para ingredientes insolubles en agua, como los aceites esenciales, porque las partes internas de las CD son hidrofílicas y las externas hidrofóbicas [43]. Las CD son biodegradables, no tóxicas y no inmunogénicas, lo que las hace seguras para su uso en aplicaciones alimentarias [16]. El alginato destaca por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para formar partículas estables, pudiendo ser modificado químicamente para mejorar su capacidad de carga y liberación de compuestos activos [15]. Respecto al quitosano, se trata de un material especialmente prometedor para la síntesis de nanotransportadores debido a sus propiedades biológicas y químicas únicas [41]. Las principales ventajas del quitosano son su capacidad para formar películas, su biodegradabilidad, y su biocompatibilidad [44,45]. Las nanopartículas de quitosano son una buena opción para el suministro de agentes antimicrobianos [46].

En el caso concreto de la aplicación en la encapsulación de agentes para la protección de cultivos, revisiones recientes del estado de conocimiento (abarcando estudios publicados hasta julio de 2022) [14] muestran que, entre los materiales anteriores, los polímeros de origen natural son la opción preferente (45%), frente a un 35% de nanotransportadores basados en polímeros sintéticos (35%), y un 19% basados en materiales inorgánicos. De entre los biopolímeros, el quitosano es la opción más habitual (36%), seguida por el alginato (23%), y las proteínas vegetales (16%).

1.3. Objetivos de la Tesis Doctoral

1.3.1. *Hipótesis de trabajo*

La presente Tesis Doctoral ha sido diseñada para abordar el reto de mejorar la eficiencia de los tratamientos de control de fitopatógenos mediante el uso de la nanotecnología como tecnología habilitadora. En línea con las directrices de la Directiva 2009/128/EC y los postulados de la Gestión Integrada de Plagas, el control de fitopatógenos debe realizarse preferentemente empleando productos naturales bioactivos (biorracionales), como las sustancias básicas en el Art. 23 del Reglamento (CE) nº 1107/2009, en lugar de los fungicidas químicos empleados actualmente. Sin embargo, la aplicación de estos productos naturales bioactivos en condiciones de campo es difícil, por sus problemas de labilidad, solubilidad y falta de especificidad. Tales limitaciones pueden solventarse mediante la nanoencapsulación, empleando nanotransportadores biopoliméricos como plataforma no tóxica y ecológica para vehicular y liberar de forma controlada los productos bioactivos. Tal proposición constituye la hipótesis de partida de la Tesis Doctoral.

1.3.2. *Objetivos generales*

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general abordar la síntesis, caracterización y ensayo de nuevos nanotransportadores de utilidad para el sector primario.

1.3.3. *Objetivos específicos*

El objetivo general ha sido abordado mediante los siguientes objetivos específicos:

- *Objetivo específico 1 (OE1):* Síntesis de nuevas estructuras a nanoescala basadas en polímeros naturales y materiales bidimensionales con propiedades catalíticas.
- *Objetivo específico 2 (OE2):* Caracterización de los nuevos materiales mediante técnicas espectroscópicas, de imagen y de análisis térmico.
- *Objetivo específico 3 (OE3):* Ensayo de los nanotransportadores a escala de laboratorio, en aplicaciones tales como control biológico; captura, inactivación y eliminación de elementos radioactivos o contaminantes tóxicos; depuración y mejora de la calidad de aguas residuales; y realización de tratamientos fitosanitarios en cultivos agroforestales.
- *Objetivo específico 4 (OE4):* Transferencia de tecnología: preparación y tramitación de patentes sobre los resultados.
- *Objetivo específico 5 (OE5):* Divulgación de resultados a la comunidad científica, en revistas indexadas y conferencias nacionales e internacionales.

1.4. Justificación de la unidad temática de los artículos

La Tesis Doctoral se compone de tres artículos científicos, con dos patentes asociadas (Anejo I). Esta producción científica comparte el uso de nanotransportadores basados en oligómeros de quitosano para la encapsulación de productos naturales con propiedades antimicrobianas, adecuados para el control de fitopatógenos; la metodología de síntesis y caracterización de dichos nanotransportadores; y la metodología de evaluación de eficacia *in vitro*. La metodología para la realización de los ensayos de eficacia *ex-situ* e *in vivo*, no obstante, varía de un estudio a otro, en función de la aplicación deseada, como se detalla en la siguiente sección.

Respecto a la composición concreta de los nanotransportadores, en el primer artículo se optó por la combinación de los oligómeros de quitosano con lignina, en el segundo con nitruro de carbono, y en el tercero con nitruro de carbono e hidroxipatito, empleando en todos los casos el

anhídrido metacrílico como agente de reticulación. Estas variaciones en la composición responden a la necesidad de adaptar las especies químicas de la encapsulación al secretoma de los patógenos para permitir la liberación controlada del producto bioactivo encapsulado y, en el caso de la introducción del nitruro de carbono, para dotar de multifuncionalidad a los nanotransportadores desarrollados (al presentar estas propiedades fotocatalíticas, abordadas en otro artículo co-autorado por el doctorando, excluido del compendio por no estar ligado a la aplicación al sector primario).

En relación con los productos a encapsular, en el primer artículo se optó por dos sustancias básicas (*Equisetum arvense* y *Urtica dioica*) y dos extractos en fase de investigación (*Rubia tinctorum* y *Silybum marianum*), previamente ensayados con éxito frente a hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* por el grupo de investigación del que forma parte el doctorando; en el segundo artículo se seleccionó el extracto que demostró mayor eficacia en el primer artículo (*Rubia tinctorum*); y en el tercer artículo se empleó un extracto de *Uncaria tomentosa*, por haber demostrado previamente una actividad antimicrobiana muy alta frente a patógenos de la fresa (*Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum*, y *Verticillium dahliae*) en otra publicación co-autorada por el doctorando (no incluida en el compendio por no centrarse en nanotransportadores, sino en el estudio de los componentes fitoquímicos del extracto y su actividad *in vitro* y *ex situ*).

En cuanto a la aplicación de los tratamientos, los dos primeros artículos se orientan al control de hongos y bacterias asociados con enfermedades de la madera (*Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Xylophilus ampelinus*, y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), uno vía endoterapia y otro para protección de heridas de poda; mientras que el tercero se centra en la protección postcosecha de frutas, ensayando la eficacia frente a *Botrytis cinerea* en fresa, *Colletotrichum gloeosporioides* en mango, *Penicillium expansum* en manzana, *Monilinia laxa* en melocotón, y *Sclerotinia sclerotiorum* en kiwi.

1.5. Metodología general

En este estudio, la metodología empleada en los tres artículos para la consecución de los objetivos programados ha sido la siguiente:

En relación con el *objetivo específico 1*, en los tres artículos se han utilizado los oligómeros de quitosano (obtenidos a partir de quitosano de peso molecular medio, siempre por vía enzimática) como principal componente para la síntesis de los *nanocarriers*. En todos los casos, la síntesis se ha realizado mediante técnicas de Química Verde, recurriendo a la ultrasonificación, y optando por el anhídrido metacrílico como agente de entrecruzamiento (que permite una eficacia de acoplamiento alta en condiciones de reacción suaves, sin afectar a la biocompatibilidad del producto final).

Respecto al *objetivo específico 2*, en los tres artículos la caracterización de los nanotransportadores se ha basado en el uso de espectroscopía infrarroja (ATR-FTIR) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). En dos de los artículos también se ha realizado caracterización térmica y análisis multielemental (CHNS o SEM-EDS), mientras que el uso de medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial zeta se limitó al primer artículo, al ser suficiente la información obtenida por TEM para determinar el índice de polidispersión. Por otra parte, los tres artículos comparten el procedimiento para la determinación de la eficiencia de encapsulación de los extractos, basado en el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y en dos de los artículos se ha empleado la misma quitosanasa (EC 3.2.1.132) para los estudios de eficiencia de liberación.

Concerniente al *objetivo específico 3*, la metodología para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* ha sido la misma en los tres artículos (método EUCAST EDef 7.2 [47]), y la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* en los dos artículos en los que se ha trabajado

con patógenos bacterianos se ha empleado la metodología CLSI M07-11 [48]. Respecto a la metodología para los ensayos de captura, inactivación y eliminación de elementos radioactivos (reducción de uranio (VI) a uranio (IV)) o contaminantes tóxicos (degradación de rodamina B), presentados en el segundo artículo, se han seguido los procedimientos definidos por Wang *et al.* [49] y Dong and Zhang [50], respectivamente, haciendo uso de medidas de absorbancia UV-Vis para el seguimiento de la concentración de los contaminantes a eliminar. En cuanto a la realización de tratamientos fitosanitarios *in vivo* en cultivos agroforestales, en el primer artículo (sobre vides, en campo) se optó por la endoterapia con un sistema de inyección ENDOkit Manual desarrollado por la empresa ENDOterapia Vegetal; mientras que en el segundo artículo (sobre heridas de poda en vid, en invernadero) se empleó la metodología descrita en publicaciones previas del grupo (véase, por ejemplo, [51] o [52]). En el tercer artículo (protección postcosecha de frutas), los ensayos *ex situ* se realizaron adaptando los procedimientos descritos en [53-55].

Referente al *objetivo específico 4*, las investigaciones recogidas en los artículos 2 y 3 de esta Tesis han sido objeto de solicitudes de patente española (una extendida internacionalmente), recogidas en el Anejo I. En ambos casos se ha contado con la financiación de la Fundación General de la Universidad de Valladolid, gracias a los premios PROMETEO 2022 y 2023, y con el apoyo de UNGRIA Patentes y Marcas para la redacción y tramitación de las patentes.

En cuanto a la relación de las dos patentes con sus artículos asociados (publicados con posterioridad a la solicitud de las primeras, para no afectar a su novedad inventiva), es preciso aclarar que las patentes recogen aspectos metodológicos de la síntesis con un grado de detalle mucho mayor que el reflejado en la metodología de los artículos, a efectos de cumplir los requerimientos del examen previo. Por contra, el grado de desarrollo de la caracterización y las aplicaciones es superior en la versión de los artículos. Así pues, ambos tipos de documentos pueden considerarse complementarios desde un punto de vista informativo.

En relación con el *objetivo específico 5*, relativo a divulgación de resultados a la comunidad científica sobre los nuevos nanotransportadores, se ha abordado mediante la publicación en revistas indexadas; recurriendo a publicaciones no indexadas en revistas de divulgación científica (véase “La revolución de la nanotecnología en agricultura”. *The Conversation*. Asociación The Conversation España, 11/05/2023, disponible en Internet en: <https://theconversation.com/la-revolucion-de-la-nanotecnologia-en-agricultura-191104>); y a través de presentaciones en congresos y jornadas organizados por la Sociedad Española de AgroIngeniería, la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, la Sociedad Española de Fitopatología, y la Universidad de Salamanca).

1.6. Bibliografía

1. Enserink, M.; Hines, P.J.; Vignieri, S.N.; Wigginton, N.S.; Yeston, J.S. The pesticide paradox. *Science* **2013**, *341*, 728-729, doi:10.1126/science.341.6147.728.
2. Nuruzzaman, M.; Rahman, M.M.; Liu, Y.; Naidu, R. Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: A new window for safe application. *J. Agric. Food. Chem.* **2016**, *64*, 1447-1483, doi:10.1021/acs.jafc.5b05214.
3. Fincheira, P.; Hoffmann, N.; Tortella, G.; Ruiz, A.; Cornejo, P.; Diez, M.C.; Seabra, A.B.; Benavides-Mendoza, A.; Rubilar, O. Eco-efficient systems based on nanocarriers for the controlled release of fertilizers and pesticides: Toward smart agriculture. *Nanomaterials* **2023**, *13*, 1978, doi:10.3390/nano13131978.
4. Yang, Y.; Aghbashlo, M.; Gupta, V.K.; Amiri, H.; Pan, J.; Tabatabaei, M.; Rajaei, A. Chitosan nanocarriers containing essential oils as a green strategy to improve the functional properties of chitosan: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *236*, 123954, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123954.
5. Xiao, D.; Wu, H.; Zhang, Y.; Kang, J.; Dong, A.; Liang, W. Advances in stimuli-responsive systems for pesticides delivery: Recent efforts and future outlook. *J. Controlled Release* **2022**, *352*, 288-312, doi:10.1016/j.jconrel.2022.10.028.
6. Tleuova, A.B.; Wielogorska, E.; Talluri, V.S.S.L.P.; Štěpánek, F.; Elliott, C.T.; Grigoriev, D.O. Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture. *J. Controlled Release* **2020**, *326*, 468-481, doi:10.1016/j.jconrel.2020.07.035.
7. Ojha, S.; Singh, D.; Sett, A.; Chetia, H.; Kabiraj, D.; Bora, U. Nanotechnology in crop protection. In *Nanomaterials in plants, algae, and microorganisms*, Tripathi, D.K., Ahmad, P., Sharma, S., Chauhan, D.K., Dubey, N.K., Eds. Academic Press: London, 2018; 10.1016/b978-0-12-811487-2.00016-5pp. 345-391.
8. Xin, X.; Judy, J.D.; Sumerlin, B.B.; He, Z. Nano-enabled agriculture: from nanoparticles to smart nanodelivery systems. *Environmental Chemistry* **2020**, *17*, 413, doi:10.1071/en19254.
9. Jain, A.; Singh, S.K.; Arya, S.K.; Kundu, S.C.; Kapoor, S. Protein nanoparticles: Promising platforms for drug delivery applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2018**, *4*, 3939-3961, doi:10.1021/acsbiomaterials.8b01098.
10. Tao, R.; You, C.; Qu, Q.; Zhang, X.; Deng, Y.; Ma, W.; Huang, C. Recent advances in the design of controlled- and sustained-release micro/nanocarriers of pesticide. *Environmental Science: Nano* **2023**, *10*, 351-371, doi:10.1039/d2en00446a.
11. Camara, M.C.; Campos, E.V.R.; Monteiro, R.A.; do Espírito Santo Pereira, A.; de Freitas Proença, P.L.; Fraceto, L.F. Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. *Journal of Nanobiotechnology* **2019**, *17*, 100, doi:10.1186/s12951-019-0533-8.
12. Rajput, V.D.; Singh, A.; Minkina, T.; Rawat, S.; Mandzhieva, S.; Sushkova, S.; Shuvaeva, V.; Nazarenko, O.; Rajput, P.; Komariah; Verma, K.K.; Singh, A.K.; Rao, M.; Upadhyay, S.K. Nano-enabled products: Challenges and opportunities for sustainable agriculture. *Plants* **2021**, *10*, 2727, doi:10.3390/plants10122727.
13. Kah, M. Nanopesticides and nanofertilizers: Emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? *Frontiers in Chemistry* **2015**, *3*, 64, doi:10.3389/fchem.2015.00064.
14. Pinto, T.V.; Silva, C.A.; Siquenique, S.; Learmonth, D.A. Micro- and nanocarriers for encapsulation of biological plant protection agents: A systematic literature review. *ACS Agricultural Science & Technology* **2022**, *2*, 838-857, doi:10.1021/acsagst.2c00113.

15. Zhou, J.; Liu, G.; Guo, Z.; Wang, M.; Qi, C.; Chen, G.; Huang, X.; Yan, S.; Xu, D. Stimuli-responsive pesticide carriers based on porous nanomaterials: A review. *Chem. Eng. J.* **2023**, *455*, 140167, doi:10.1016/j.cej.2022.140167.
16. Bahrami, A.; Delshadi, R.; Assadpour, E.; Jafari, S.M.; Williams, L. Antimicrobial-loaded nanocarriers for food packaging applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *278*, 102140, doi:10.1016/j.cis.2020.102140.
17. Li, R.; Feng, C.; Yang, R.; Li, X.; Ruan, L. Drug molecules bridge with small gatekeeper to co-block mesoporous silica nanoparticles for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2022**, *213*, 112350, doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112350.
18. Liang, Y.; Gao, Y.; Wang, W.; Dong, H.; Tang, R.; Yang, J.; Niu, J.; Zhou, Z.; Jiang, N.; Cao, Y. Fabrication of smart stimuli-responsive mesoporous organosilica nano-vehicles for targeted pesticide delivery. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *389*, 122075, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122075.
19. Gu, S.; Kang, X.; Wang, L.; Lichtfouse, E.; Wang, C. Clay mineral adsorbents for heavy metal removal from wastewater: a review. *Environmental Chemistry Letters* **2018**, *17*, 629-654, doi:10.1007/s10311-018-0813-9.
20. Vontas, J.; Galán-Jiménez, M.d.C.; Mishael, Y.-G.; Nir, S.; Morillo, E.; Undabeytia, T. Factors affecting the design of slow release formulations of herbicides based on clay-surfactant systems. A methodological approach. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59060, doi:10.1371/journal.pone.0059060.
21. Zhou, Z.; Vázquez-González, M.; Willner, I. Stimuli-responsive metal-organic framework nanoparticles for controlled drug delivery and medical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 4541-4563, doi:10.1039/d0cs01030h.
22. Meng, W.; Tian, Z.; Yao, P.; Fang, X.; Wu, T.; Cheng, J.; Zou, A. Preparation of a novel sustained-release system for pyrethroids by using metal-organic frameworks (MOFs) nanoparticle. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2020**, *604*, 125266, doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125266.
23. Ferreira, A.M.; Vikulina, A.S.; Volodkin, D. CaCO₃ crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials. *J. Controlled Release* **2020**, *328*, 470-489, doi:10.1016/j.jconrel.2020.08.061.
24. Naguib, M.; Kurtoglu, M.; Presser, V.; Lu, J.; Niu, J.; Heon, M.; Hultman, L.; Gogotsi, Y.; Barsoum, M.W. Two-dimensional nanocrystals produced by exfoliation of Ti₃AlC₂. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4248-4253, doi:10.1002/adma.201102306.
25. Kim, S.; Yu, M.; Yoon, Y. Fouling and retention mechanisms of selected cationic and anionic dyes in a Ti₃C₂T_x MXene-ultrafiltration hybrid system. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2020**, *12*, 16557-16565, doi:10.1021/acsami.0c02454.
26. Song, S.; Jiang, X.; Shen, H.; Wu, W.; Shi, Q.; Wan, M.; Zhang, J.; Mo, H.; Shen, J. MXene (Ti₃C₂) based pesticide delivery system for sustained release and enhanced pest control. *ACS Applied Bio Materials* **2021**, *4*, 6912-6923, doi:10.1021/acsabm.1c00607.
27. Wu, W.; Wan, M.; Fei, Q.; Tian, Y.; Song, S.; Shen, H.; Shen, J. PDA@Ti₃C₂T_x as a novel carrier for pesticide delivery and its application in plant protection: NIR-responsive controlled release and sustained antipest activity. *Pest Management Science* **2021**, *77*, 4960-4970, doi:10.1002/ps.6538.
28. Tyler, B.; Gullotti, D.; Mangraviti, A.; Utsuki, T.; Brem, H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *107*, 163-175, doi:10.1016/j.addr.2016.06.018.
29. Da Costa, D.; Exbrayat-Héritier, C.; Rambaud, B.; Megy, S.; Terreux, R.; Verrier, B.; Primard, C. Surface charge modulation of rifampicin-loaded PLA nanoparticles to improve antibiotic

-
- delivery in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Nanobiotechnology* **2021**, *19*, 12, doi:10.1186/s12951-020-00760-w.
30. Yang, L.; Han, L.; Jia, L. A novel platelet-repellent polyphenolic surface and its micropattern for platelet adhesion detection. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 26570-26577, doi:10.1021/acsami.6b08930.
 31. Jia, X.; Sheng, W.-b.; Li, W.; Tong, Y.-b.; Liu, Z.-y.; Zhou, F. Adhesive polydopamine coated avermectin microcapsules for prolonging foliar pesticide retention. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, 19552-19558, doi:10.1021/am506458t.
 32. Qin, H.; Zhang, H.; Li, L.; Zhou, X.; Li, J.; Kan, C. Preparation and properties of lambda-cyhalothrin/polyurethane drug-loaded nanoemulsions. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 52684-52693, doi:10.1039/c7ra10640h.
 33. Zhang, H.; Qin, H.; Li, L.; Zhou, X.; Wang, W.; Kan, C. Preparation and characterization of controlled-release avermectin/castor oil-based polyurethane nanoemulsions. *J. Agric. Food. Chem.* **2017**, *66*, 6552-6560, doi:10.1021/acs.jafc.7b01401.
 34. Faridi Esfanjani, A.; Assadpour, E.; Jafari, S.M. Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *76*, 56-66, doi:10.1016/j.tifs.2018.04.002.
 35. Rafiee, Z.; Jafari, S.M. Application of lipid nanocarriers for the food industry. In *Bioactive molecules in food*, Mérillon, J.-M., Ramawat, K.G., Eds. Springer Cham: Cham, Switzerland, 2018; 10.1007/978-3-319-54528-8_93-1pp. 1-43.
 36. Hao, L.; Lin, G.; Lian, J.; Chen, L.; Zhou, H.; Chen, H.; Xu, H.; Zhou, X. Carboxymethyl cellulose capsulated zein as pesticide nano-delivery system for improving adhesion and anti-UV properties. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *231*, 115725, doi:10.1016/j.carbpol.2019.115725.
 37. Idrees, H.; Zaidi, S.Z.J.; Sabir, A.; Khan, R.U.; Zhang, X.; Hassan, S.-u. A review of biodegradable natural polymer-based nanoparticles for drug delivery applications. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1970, doi:10.3390/nano10101970.
 38. Monteiro, R.A.; Camara, M.C.; de Oliveira, J.L.; Campos, E.V.R.; Carvalho, L.B.; Proença, P.L.d.F.; Guilger-Casagrande, M.; Lima, R.; do Nascimento, J.; Gonçalves, K.C.; Polanczyk, R.A.; Fraceto, L.F. Zein based-nanoparticles loaded botanical pesticides in pest control: An enzyme stimuli-responsive approach aiming sustainable agriculture. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *417*, 126004, doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126004.
 39. Hao, L.; Lin, G.; Chen, C.; Zhou, H.; Chen, H.; Zhou, X. Phosphorylated zein as biodegradable and aqueous nanocarriers for pesticides with sustained-release and anti-UV properties. *J. Agric. Food. Chem.* **2019**, *67*, 9989-9999, doi:10.1021/acs.jafc.9b03060.
 40. Wu, J.; Liu, H.; Ge, S.; Wang, S.; Qin, Z.; Chen, L.; Zheng, Q.; Liu, Q.; Zhang, Q. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids* **2015**, *43*, 427-435, doi:10.1016/j.foodhyd.2014.06.017.
 41. Sánchez-Hernández, E.; Langa-Lomba, N.; González-García, V.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Santiago-Aliste, A.; Torres-Sánchez, S.; Martín-Ramos, P. Lignin–chitosan nanocarriers for the delivery of bioactive natural products against wood-decay phytopathogens. *Agronomy* **2022**, *12*, 461, doi:10.3390/agronomy12020461.
 42. Neri-Badang, M.C.; Chakraborty, S. Carbohydrate polymers as controlled release devices for pesticides. *J. Carbohydr. Chem.* **2019**, *38*, 67-85, doi:10.1080/07328303.2019.1568449.
 43. Esfanjani, A.F.; Jafari, S.M. Nanoencapsulation of phenolic compounds and antioxidants. In *Nanoencapsulation of food bioactive ingredients: Principles and applications*, Jafari, S.M., Ed. Academic Press: London, UK, 2017; 10.1016/b978-0-12-809740-3.00002-7; pp. 63-101.

44. Dehnad, D.; Emam-Djomeh, Z.; Mirzaei, H.; Jafari, S.-M.; Dadashi, S. Optimization of physical and mechanical properties for chitosan–nanocellulose biocomposites. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *105*, 222-228, doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.094.
45. Dehnad, D.; Mirzaei, H.; Emam-Djomeh, Z.; Jafari, S.-M.; Dadashi, S. Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *109*, 148-154, doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.063.
46. Sotelo-Boyás, M.E.; Correa-Pacheco, Z.N.; Bautista-Baños, S.; Corona-Rangel, M.L. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *Lwt* **2017**, *77*, 15-20, doi:10.1016/j.lwt.2016.11.022.
47. Arendrup, M.C.; Cuenca-Estrella, M.; Lass-Flörl, C.; Hope, W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, E246-E247, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x.
48. CLSI. CLSI standard M07 - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (11th ed). Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
49. Wang, J.; Wang, Y.; Wang, W.; Ding, Z.; Geng, R.; Li, P.; Pan, D.; Liang, J.; Qin, H.; Fan, Q. Tunable mesoporous g-C₃N₄ nanosheets as a metal-free catalyst for enhanced visible-light-driven photocatalytic reduction of U(VI). *Chem. Eng. J.* **2020**, *383*, 123193, doi:10.1016/j.cej.2019.123193.
50. Dong, G.; Zhang, L. Porous structure dependent photoreactivity of graphitic carbon nitride under visible light. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 1160-1166, doi:10.1039/c1jm14312c.
51. Langa-Lomba, N.; Buzón-Durán, L.; Martín-Ramos, P.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Sánchez-Hernández, E.; González-García, V. Assessment of conjugate complexes of chitosan and *Urtica dioica* or *Equisetum arvense* extracts for the control of grapevine trunk pathogens. *Agronomy* **2021**, *11*, 976, doi:10.3390/agronomy11050976.
52. Buzón-Durán, L.; Langa-Lomba, N.; González-García, V.; Casanova-Gascón, J.; Sánchez-Hernández, E.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Rutin-stevioside and related conjugates for potential control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* **2022**, *61*, 65-77, doi:10.36253/phyto-13108.
53. Onaran, A.; Yanar, Y. *In vivo* and *in vitro* antifungal activities of five plant extracts against various plant pathogens. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* **2016**, *26*, 405-411.
54. Hernández-Muñoz, P.; Almenar, E.; Valle, V.D.; Velez, D.; Gavara, R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria×ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chem.* **2008**, *110*, 428-435, doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.020.
55. Sánchez-Hernández, E.; Álvarez-Martínez, J.; González-García, V.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. *Helichrysum stoechas* (L.) Moench inflorescence extract for tomato disease management. *Molecules* **2023**, *28*, 5861, doi:10.3390/molecules28155861.

2. Compendio de publicaciones

2.1. Artículo 1

Lignin–chitosan nanocarriers for the delivery of bioactive natural products against wood-decay phytopathogens

Agronomy, 2022, 12(2), 461; <https://doi.org/10.3390/agronomy12020461>

Q1 JCR (Science Edition – AGRONOMY), JIF2022 = 3,7.

Eva Sánchez-Hernández¹; Natalia Langa-Lomba^{2,3}; Vicente González-García³; José Casanova-Gascón²; Jesús Martín-Gil¹; Alberto Santiago-Aliste¹; Sergio Torres-Sánchez⁴; Pablo Martín Ramos^{2*}

¹ Department of Agricultural and Forestry Engineering, ETSIIAA, University of Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, Spain

² Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), EPS, University of Zaragoza, Carretera de Cuarte s/n, 22071 Huesca, Spain

³ Plant Protection Unit, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain

⁴ Viñas del Vero S.A., Carretera Nacional 123 (km 3.7), 22300 Barbastro, Spain

* Author to whom correspondence should be addressed.

Abstract: The use of nanocarriers (NCs), i.e., nanomaterials capable of encapsulating drugs and releasing them selectively, is an emerging field in agriculture. In this study, the synthesis, characterization, and in vitro and in vivo testing of biodegradable NCs loaded with natural bioactive products was investigated for the control of certain phytopathogens responsible for wood degradation. In particular, NCs based on methacrylated lignin and chitosan oligomers, loaded with extracts from *Rubia tinctorum*, *Silybum marianum*, *Equisetum arvense*, and *Urtica dioica*, were first assayed in vitro against *Neofusicoccum parvum*, an aggressive fungus that causes cankers and diebacks in numerous woody hosts around the world. The in vitro antimicrobial activity of the most effective treatment was further explored against another fungal pathogen and two bacteria related to trunk diseases: *Diplodia seriata*, *Xylophilus ampelinus*, and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, respectively. Subsequently, it was evaluated in field conditions, in which it was applied by endotherapy for the control of grapevine trunk diseases. In the in vitro mycelial growth inhibition tests, the NCs loaded with *R. tinctorum* resulted in EC₉₀ concentrations of 65.8 and 91.0 µg·mL⁻¹ against *N. parvum* and *D. seriata*, respectively. Concerning their antibacterial activity, a minimum inhibitory concentration of 37.5 µg·mL⁻¹ was obtained for this treatment against both phytopathogens. Upon application via endotherapy on 20-year-old grapevines with clear esca and Botryosphaeria decay symptoms, no phytotoxicity effects were observed (according to SPAD and chlorophyll fluorescence measurements) and the sugar content of the grape juice was not affected either. Nonetheless, the treatment led to a noticeable decrease in foliar symptoms as well as a higher yield in the treated arms as compared to the control arms (3177 vs. 1932 g/arm), suggestive of high efficacy. Given the advantages in terms of controlled release and antimicrobial product savings, these biodegradable NCs loaded with natural extracts may deserve further research in large-scale field tests.

Keywords: *Equisetum arvense*; grapevine trunk diseases; natural bioactive products; NCs; *Rubia tinctorum*; *Silybum marianum*; *Urtica dioica*

2.2. Artículo 2

Multifunctional nanocarriers based on chitosan oligomers and graphitic carbon nitride assembly

Materials, 2022; 15(24), 8981; <https://doi.org/10.3390/ma15248981>

Q2 JCR (Science Edition - METALLURGY & METALLURGICAL ENGINEERING), JIF2022 = 3,4.

Alberto Santiago-Aliste¹, Eva Sánchez-Hernández^{1,*}, Natalia Langa-Lomba^{2,3}, Vicente González-García³, José Casanova-Gascón², Jesús Martín-Gil¹, Pablo Martín-Ramos^{1,2,*}

¹ Department of Agricultural and Forestry Engineering, ETSIIAA, University of Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, Spain

² Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), EPS, University of Zaragoza, Carretera de Cuarte s/n, 22071 Huesca, Spain

³ Plant Protection Unit, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Abstract: In this study, a graphitic carbon nitride and chitosan oligomers (g-C₃N₄-COS) nanocarrier assembly, which was obtained by cross-linking with methacrylic anhydride (MA), was synthesized and characterized. Its characterization was carried out using infrared spectroscopy, elemental and thermal analyses, and transmission electron microscopy. The new nanocarriers (NCs), with an average particle size of 85 nm in diameter and a 0.25 dispersity index, showed photocatalytic activity (associated with the g-C₃N₄ moiety), susceptibility to enzymatic degradation (due to the presence of the COS moiety), and high encapsulation and moderate-high release efficiencies (>95% and >74%, respectively). As a proof of concept, the visible-light-driven photocatalytic activity of the NCs was tested for rhodamine B degradation and the reduction of uranium(VI) to uranium(IV). Regarding the potential of the nanocarriers for the encapsulation and delivery of bioactive products for crop protection, NCs loaded with *Rubia tinctorum* extracts were investigated in vitro against three *Vitis vinifera* phytopathogens (viz. *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, and *Xylophilus ampelinus*), obtaining minimum inhibitory concentration values of 750, 250, and 187.5 µg·mL⁻¹, respectively. Their antifungal activity was further tested in vivo as a pruning wound protection product in young ‘Tempranillo’ grapevine plants that were artificially infected with the two aforementioned species of the family *Botryosphaeriaceae*, finding a significant reduction of the necrosis lengths in the inner woody tissues. Therefore, g-C₃N₄-MA-COS NCs may be put forward as a multifunctional platform for environmental and agrochemical delivery applications.

Keywords: chitosan oligomers; cross-linking; g-C₃N₄; grapevine phytopathogens; integrated pest management; methacrylic anhydride; photocatalytic degradation; photocatalytic reduction

2.3. Artículo 3

***Uncaria tomentosa*-loaded chitosan oligomers–hydroxyapatite–carbon nitride nanocarriers for postharvest fruit protection**

Agronomy, 2023, 13(9), 2189; <https://doi.org/10.3390/agronomy13092189>
Q1 JCR (Science Edition – AGRONOMY), JIF2022 = 3,7.

Alberto Santiago-Aliste¹, Eva Sánchez-Hernández¹, Laura Buzón-Durán^{1,*}, José Luis Marcos-Robles², Jesús Martín-Gil¹, Pablo Martín-Ramos^{1,*}

¹ Department of Agricultural and Forestry Engineering, ETSIIAA, University of Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, Spain

² Department of Materials Science and Metallurgical Engineering, Engineering Graphics, Engineering Cartography, Geodesy and Photogrammetry, Mechanical Engineering and Manufacturing Process Engineering, ETSIIAA, University of Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, Spain

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Abstract: Given the risks associated with synthetic fungicides, it is crucial to explore safe and sustainable alternatives. One potential solution is using bioactive natural products (BNPs). However, BNPs face challenges like lability, solubility, and lack of specificity. These issues can be addressed through nanoencapsulation. This study focuses on the evaluation of novel chitosan oligomers–hydroxyapatite–carbon nitride (COS–HAp–g-C₃N₄) nanocarriers (NCs) for encapsulating BNPs, specifically an extract from *Uncaria tomentosa* bark. The NCs were characterized by transmission electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy, and infrared spectroscopy. The NCs were monodisperse, with a mean diameter of 250 nm, and showed an encapsulation efficiency of 82%. The suitability of the loaded NCs (COS–HAp–g-C₃N₄–BNP, in a 2:1:0.5:1 weight ratio) for postharvest fruit protection was investigated in vitro and ex situ at a laboratory scale. Results regarding their efficacy against *Botrytis cinerea* on strawberries, *Colletotrichum gloeosporioides* on mangoes, *Penicillium expansum* on apples, *Monilinia laxa* on peaches, and *Sclerotinia sclerotiorum* on kiwifruit are presented. Minimum inhibitory concentrations of 250, 375, 375, 250, and 187.5 µg·mL⁻¹ were found in vitro, respectively, while higher doses (500, 750, 750, 250, and 375 µg·mL⁻¹, respectively) were needed to achieve effective control in postharvest tests on artificially inoculated fruit. These findings suggest that NCs containing extracts from *U. tomentosa* bark show promise as biorational agents and as alternatives to conventional fungicides for managing postharvest phytopathogens.

Keywords: cat's claw; biopolymeric nanoparticles; chitosan oligomers; g-C₃N₄; nanoencapsulation; natural fungicides; postharvest fruit diseases; stimuli-responsive systems; shelf-life extension; sustainable crop protection

3. Conclusiones

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. El uso de nanotransportadores basados en oligómeros de quitosano, sintetizados utilizando anhídrido metacrílico como agente de entrecruzamiento y ultrasonificación, constituye una solución eficaz para vehiculización y liberación selectiva (por exposición al secretoma de los fitopatógenos) de extractos de plantas con actividad antimicrobiana (*Urtica dioica*, *Equisetum arvense*, *Silybum marianum*, *Rubia tinctorum*, y *Uncaria tomentosa*), en tanto en cuanto permite solventar problemas de labilidad y solubilidad y mejorar la eficacia, con el consiguiente ahorro de producto activo.
2. La combinación de oligómeros de quitosano con lignina metacrilada para la preparación de nanotransportadores es apropiada para el tratamiento de enfermedades de la madera. El uso de oligómeros de quitosano en lugar de diaminas (empleadas en otras investigaciones) facilita la encapsulación de los compuestos bioactivos por una mayor interacción (a cuenta de la presencia de grupos hidroxilo adicionales a los amino); y mejora la eficacia antimicrobiana, por los mecanismos no-específicos de supresión de patógenos asociados al quitosano. Su aplicación como tratamiento en plantas de vid, con extracto de *Rubia tinctorum* como biorracional encapsulado más eficaz, logra reducir notablemente los síntomas foliares de la yesca, sin fitotoxicidad ni impactos negativos sobre la calidad de la uva.
3. El uso de nitruro de carbono como especie co-encapsulante de los oligómeros de quitosano para la formación de los nanotransportadores, además de mejorar la actividad antimicrobiana asociada a los oligómeros de quitosano, los dota de actividad fotocatalítica. Los nanotransportadores resultantes no sólo permiten la vehiculización y liberación controlada de productos bioactivos, ensayada para la protección de heridas de poda frente a patógenos de la madera de la vid con reducciones significativas en las necrosis internas, sino que también son capaces también de degradar contaminantes recalcitrantes como la rodamina B y reducir uranio(VI) a uranio(IV). Así pues, el uso de nanotransportadores COS-g-C₃N₄ supone una mejora en términos de versatilidad frente a los nanotransportadores basados en quitosano tradicionales.
4. La inclusión de hidroxiapatito como tercera especie co-encapsulante, avalada por sus características de biodegradabilidad y biocompatibilidad, actividad superficial y alta relación área superficial-volumen, permite la optimización de los nanotransportadores COS-g-C₃N₄ arriba referidos, en tanto en cuanto facilita la formación de nanoesferas (contrarrestando la tendencia del nitruro de carbono a una disposición laminar) y la encapsulación de compuestos bioactivos. Su utilización para la vehiculización y liberación controlada de extracto de corteza de *Uncaria tomentosa* en tratamientos postcosecha ha demostrado un amplio espectro de actividad antifúngica, con eficacias superiores a las de fungicidas sistémicos organofosforados e inhibidores externos de quinona.

Anejo I: Patentes

PATENTE 1: “Nanomaterial basado en el autoensamblaje de g-C₃N₄ y oligómeros de quitosano, proceso de obtención y usos”. Patente española con número de solicitud P202230668, presentada el 20 de julio de 2022. Ampliada con solicitud internacional PCT/ES2023/070409.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. De acuerdo con lo dispuesto en el art. 16.1 del Reglamento de ejecución de la Ley 24/2015 de Patentes, se han asignado a su solicitud un número de expediente y una fecha de recepción de forma automática. La fecha de presentación de la solicitud a la que se refiere el art. 24 de la Ley le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P202230668
Fecha de recepción:	20 julio 2022, 12:33 (CEST)
Oficina receptora:	OEPM Madrid



TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES NOTIFICACIÓN DE LA RECEPCIÓN DE LOS DOCUMENTOS QUE CONSTITUYEN SUPUESTAMENTE UNA SOLICITUD INTERNACIONAL PRESENTADA DE FORMA ELECTRÓNICA.

(Instrucciones Administrativas del PCT, Parte Séptima)

- 1.-Se notifica al solicitante que la Oficina Receptora ha recibido en la fecha de recepción indicada más abajo, los documentos que supuestamente constituyen una solicitud internacional.
- 2.-Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que la Oficina Receptora no ha comprobado aún si estos documentos satisfacen las condiciones del art. 11.1, es decir, si cumple los requisitos para que le sea atribuida una fecha de presentación internacional. En cuanto la Oficina Receptora haya comprobado los documentos, avisará al solicitante.
- 3.-El número de la supuesta solicitud internacional indicado más abajo ha sido otorgado automáticamente a estos documentos. Se invita al solicitante a mencionar este número en toda la correspondencia con la Oficina Receptora.

Número de presentación	300486618
Solicitud Número PCT	PCT/ES2023/070409
Fecha de recepción	23 junio 2023
Oficina Receptora	Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid

PATENTE 2: “Nanomaterial encapsulante formado por g-C₃N₄ y oligómeros de quitosano enlazados a hidroxiapatito, proceso de obtención y usos”. Patente española con número de solicitud P202330435, presentada el 31 de mayo de 2023.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. De acuerdo con lo dispuesto en el art. 16.1 del Reglamento de ejecución de la Ley 24/2015 de Patentes, se han asignado a su solicitud un número de expediente y una fecha de recepción de forma automática. La fecha de presentación de la solicitud a la que se refiere el art. 24 de la Ley le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P202330435
Fecha de recepción:	31 mayo 2023, 14:27 (CEST)
Oficina receptora:	OEPM Madrid