



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

Nanotecnología aplicada a la gestión sostenible
de *Botrytis cinerea* en viticultura

Alumna: Francisca-Leke Díez Gutiérrez

Tutor: Pablo Martín Ramos

Tutora: Eva Sánchez Hernández

Junio de 2025

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Jesús Martín Gil, figura destacada de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, por compartir su sabiduría y experiencia en las técnicas de laboratorio.

A mis tutores, el Profesor Pablo Martín Ramos y la Dra. Eva Sánchez Hernández, cuyo compromiso, orientación y respaldo han resultado esenciales para completar con éxito este Trabajo Fin de Máster.

A mi madre, por su constante respaldo y comprensión a lo largo de esta etapa.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento. Este trabajo refleja su apoyo y todo lo que me han enseñado.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Importancia de la vitivinicultura en España	5
2.2. Enfermedades de los viñedos.....	5
2.2.1. Podredumbre gris (<i>Botrytis cinerea</i>).....	6
2.3. Métodos tradicionales de control de <i>Botrytis cinerea</i>	9
2.3.1. Control químico.....	9
2.3.2. Control biológico microbiano	10
2.3.3. Otras alternativas para su control	15
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1. Reactivos y aislados fúngicos	23
4.2. Material vegetal y preparación de los extractos a encapsular	23
4.3. Preparación oligómeros de quitosano (COS), nitruro de carbono grafítico (g-C ₃ N ₄) e hidroxiapatito (HAp)	24
4.4. Síntesis de los nanotransportadores	25
4.5. Encapsulación y liberación de los extractos	26
4.6. Caracterización de los nanotransportadores	26
4.7. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro	27
4.8. Preparación de la suspensión de conidios fúngicos	28
4.9. Ensayos de protección <i>ex situ</i>	28
4.10. Ensayos de campo.....	29
4.11. Vinificación del mosto	31
4.12. Análisis estadístico.....	34

5. RESULTADOS	36
5.1. Caracterización de los extractos vegetales	36
5.2. Caracterización de los nanotransportadores	37
5.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	38
5.4. Protección de las uvas <i>ex situ</i>	39
5.5. Ensayos de campo	41
5.6. Influencia de los tratamientos sobre la calidad del mosto	43
6. DISCUSIÓN.....	46
6.1. Comparativa de la eficacia de los extractos sin encapsular.....	46
6.2. Comparativa de la eficacia de los extractos encapsulados	48
6.3. Mecanismo de actuación	52
6.4. Impacto de los tratamientos.....	53
6.5. Aplicabilidad, limitaciones del estudio y líneas futuras de investigación.....	55
7. CONCLUSIONES	59
8. BIBLIOGRAFÍA	61

1. RESUMEN

1. RESUMEN

La podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* Pers. constituye una de las enfermedades fúngicas más limitantes en la viticultura a nivel mundial. El uso intensivo de fungicidas sintéticos ha generado problemas de resistencia y preocupaciones ambientales, impulsando la búsqueda de alternativas sostenibles. Este trabajo evalúa la eficacia de nanotransportadores basados en oligómeros de quitosano (COS) para la liberación controlada de extractos antifúngicos naturales de *Rubia tinctorum* L. y *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. contra *B. cinerea* en vid. Se desarrollaron dos sistemas de nanoencapsulación: COS combinado con nitruro de carbono (g-C₃N₄) cargado con extracto de *R. tinctorum*, y COS-hidroxiapatito (HAp)-g-C₃N₄ cargado con extracto de *U. tomentosa*. Los ensayos de laboratorio demostraron una inhibición significativa del patógeno, con mayor efectividad para el sistema con hidroxiapatito y nitruro de carbono (COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa*; concentración mínima inhibitoria, CMI = 250 µg/mL) que para el sistema sin hidroxiapatito (COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum*; CMI = 375 µg/mL). En ensayos *ex situ* en uvas “Tempranillo” y “Verdejo” se logró un control efectivo a concentraciones superiores a las determinadas *in vitro* (CMI×3). Los ensayos de campo en la D.O.P. Ribera de Duero confirmaron la eficacia superior de las formulaciones nanoencapsuladas (68,8-77,5 %) frente a los extractos no encapsulados (50,0-56,3 %) y el quitosano comercial (53,8 %). Los tratamientos no mostraron síntomas de fitotoxicidad ni afectaron a las propiedades fisicoquímicas del mosto. Estos resultados muestran que la nanoencapsulación de productos naturales bioactivos ofrece una alternativa ecológica y eficaz a los fungicidas convencionales para la gestión sostenible de la podredumbre gris en viticultura.

Palabras clave: moho gris, nanotecnología, quitosano, productos naturales, viticultura sostenible

Abstract

Grey mould caused by *Botrytis cinerea* Pers. constitutes one of the most limiting fungal diseases in viticulture worldwide. The intensive use of synthetic fungicides has generated resistance problems and environmental concerns, driving the search for sustainable alternatives. This work evaluates the efficacy of nanocarriers based on chitosan oligomers (COS) for the controlled release of natural antifungal extracts from *Rubia tinctorum* L. and *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. against *B. cinerea* in grapevines. Two nanoencapsulation systems were developed: COS combined with carbon nitride (g-C₃N₄) loaded with *R. tinctorum* extract, and COS-hydroxyapatite (HAp)-g-C₃N₄ loaded with *U. tomentosa* extract. Laboratory assays demonstrated significant pathogen inhibition, with greater effectiveness for the system with hydroxyapatite and carbon nitride (COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa*; minimum inhibitory concentration, MIC = 250 µg/mL) than for the system without hydroxyapatite (COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum*; MIC = 375 µg/mL). In *ex situ* trials on “Tempranillo” and “Verdejo” grapes, effective control was achieved at concentrations higher than those determined *in vitro* (MIC×3). Field trials in the D.O.P. Ribera de Duero confirmed the superior efficacy of nanoencapsulated formulations (68.8-77.5 %) compared to non-encapsulated extracts (50.0-56.3 %) and commercial chitosan (53.8 %). The treatments showed no symptoms of phytotoxicity nor affected the physicochemical properties of the must. These results show that nanoencapsulation of bioactive natural products offers an ecological and effective alternative to conventional fungicides for sustainable management of grey mould in viticulture.

Keywords: grey mould, nanotechnology, chitosan, natural products, sustainable viticulture

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Importancia de la vitivinicultura en España

El sector vitivinícola representa uno de los pilares fundamentales del sector agrario español. Por un lado, incluye el cultivo y estudio técnico de la vid (*Vitis vinifera* L.) junto con la producción de uva (Gil y Pszczólkowski, 2007), y por otro, los procesos de vinificación y obtención final del vino.

España mantiene su posición como líder mundial en superficie de viñedo dedicada a la producción de vino, con 911.080 hectáreas en 2024 (OEMV, 2025). Esta importante superficie dedicada al cultivo de la vid, combinada con el considerable número de explotaciones vitivinícolas, sitúa a España entre los mayores productores de vino del mundo, junto con Italia y Francia. En términos de producción, en 2024 se alcanzaron los 33,6 millones de hectolitros de vino (OIV, 2025). Aunque el consumo interno de vino ha mostrado un crecimiento, llegando a los 9,7 millones de hectolitros en la campaña 2023/2024 (FEAE, 2024), España es el principal exportador mundial de vino, enviando cerca de 20,2 millones de hectolitros al mercado internacional en la última campaña (OEMV, 2024).

Este liderazgo mundial de la industria vitivinícola se traduce en un papel importante en la economía española, generando alrededor de 20.330 millones de euros y representando aproximadamente el 1,9 % del Producto Interior Bruto (PIB) nacional (OIVE, 2024). Este peso económico se ve reforzado por un sistema consolidado de certificación de calidad, que cuenta actualmente con 105 Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), a las que se suman otras 43 Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) (MAPA, 2025).

2.2. Enfermedades de los viñedos

La vid (*V. vinifera*), originaria de las regiones cercanas a los mares Negro y Caspio en Asia, representa uno de los cultivos frutícolas más significativos a nivel mundial, tanto por su extensión como por su valor económico (Bouquet et al., 2006). No obstante, este cultivo se enfrenta a numerosos retos debido a su susceptibilidad a diversas enfermedades, deficiencias y plagas, que afectan considerablemente en su rendimiento (Tardif et al., 2023).

Entre las enfermedades fúngicas con mayor impacto económico destacan el oídio (*Uncinula necator* (Schwein.) Burrill), el mildiu (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A.Curtis)

Berl. & De Toni) y la podredumbre gris (*Botrytis cinerea* Pers.) (Casanova Gascón et al., 2019). De estas enfermedades, la podredumbre gris constituye el foco de esta investigación.

2.2.1. Podredumbre gris (*Botrytis cinerea*)

La enfermedad fúngica causada por el hongo polífago *B. cinerea*, presente en todos los viñedos de España, se manifiesta con especial intensidad en regiones húmedas del norte y en la zona costera mediterránea. Recibe diferentes denominaciones según la región, siendo conocida como podredumbre gris, *Botrytis* de la vid, o moho gris. Una característica distintiva de este hongo es su versatilidad como fitopatógeno, ya que no se limita exclusivamente a la vid, sino que puede afectar a muchas plantas silvestres y cultivadas. Además, se trata de un hongo necrótrofo facultativo con capacidad saprófita, lo que le permite además utilizar materia orgánica en descomposición como fuente de nutrientes, desde donde puede expandirse para infectar tejidos vegetales sanos. En los viñedos, la *Botrytis* afecta a todos los órganos de la cepa, aunque su impacto es especialmente significativo en los racimos durante el periodo entre el envero y maduración, pudiendo llegar a provocar pérdidas de entre el 30 y 40 % de la producción total (Kasfi et al., 2018).

Aunque las esporas de *B. cinerea* pueden dispersarse por vía aérea desde cultivos cercanos, la mayor parte del inóculo que desencadena el brote de *Botrytis* se origina dentro del propio viñedo. El desarrollo de la podredumbre del racimo ocurre mediante dos mecanismos principales de infección (FIGURA 2.1):

Primera vía: infección latente primaria. La infección inicial se produce durante la floración, especialmente cuando se desprende el capuchón floral, generando pequeñas heridas que facilitan la entrada del patógeno. Sin embargo, esta infección permanece latente durante el desarrollo temprano del grano debido a que el hollejo joven produce sustancias antifúngicas naturales que limitan la propagación de *B. cinerea*. Esta protección natural se reduce progresivamente durante la maduración, momento en que los racimos alcanzan su máxima susceptibilidad. Entonces, las infecciones latentes se reactivan y pueden extenderse de una baya a otra, pudiendo llegar a pudrir todo el racimo (Beresford y Hill, 2008).

Segunda vía: infección desde reservorios internos. Los restos vegetales presentes en el viñedo (hojas senescentes, restos de poda, etc.) son colonizados por *B. cinerea* al inicio de la temporada, convirtiéndose en reservorios de inóculo. Estos focos internos constituyen una

fuentes continuas de esporas que pueden infectar las bayas durante la maduración, cuando estas han perdido sus defensas antifúngicas naturales (Beresford y Hill, 2008).

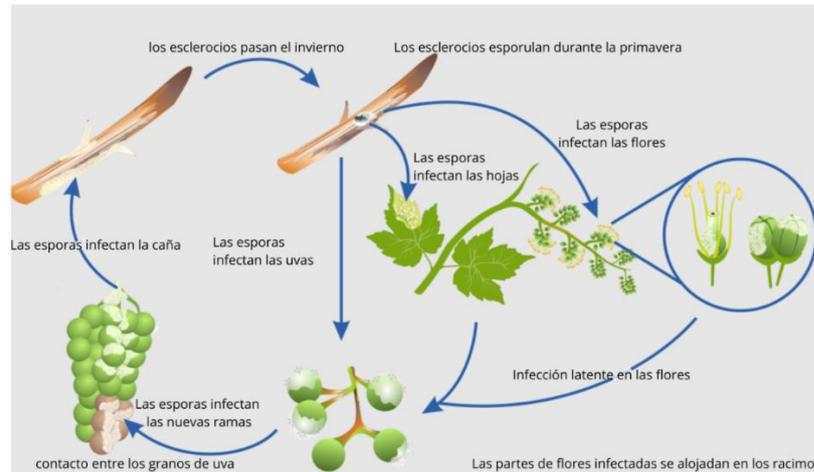


FIGURA 2.1. Ciclo biológico de *Botrytis cinerea* en la podredumbre del racimo. Fuente: Adaptado de Beresford y Hill, 2008.

El desarrollo de este fitopatógeno está altamente condicionado por los factores climáticos. Los conidios del hongo encuentran sus condiciones óptimas de germinación cuando la temperatura se mantiene entre los 15 y 20 °C, junto con periodos de humedad constante de 15 horas o más. La proliferación del micelio alcanza su punto óptimo cuando la temperatura se sitúa entre los 23 y 25 °C, requiriendo además una humedad relativa que oscile entre el 80 y 85 % (Casanova Gascón et al., 2019).

Botrytis cinerea afecta a todos los órganos verdes de la vid, pero principalmente a los racimos entre el envero y la madurez. Los síntomas y daños más importantes son (Alves Santos, 2024):

En hojas, causa daños de escasa importancia, manifestándose en el borde del limbo necrosis similares a quemaduras que en condiciones de humedad pueden presentar una capa de polvillo grisáceo en sus bordes (FIGURA 2.2).



FIGURA 2.2. Ataque de *B.cinerea* en hoja. Fuente: ITACYL.

En brotes jóvenes y sarmientos, los primeros síntomas se manifiestan a través de manchas alargadas de color “achocolatado” que se recubren de una pelusilla grisácea si el tiempo es húmedo, correspondiente con la fructificación del hongo (FIGURA 2.3). Hacia el final del ciclo vegetativo, estas manchas se vuelven negras sobre fondo blanquecino a lo largo del sarmiento, siendo más evidentes en los extremos, que se secan incorrectamente y pierden firmeza. Los ataques severos pueden destruir brotes jóvenes, reduciendo inmediatamente la cosecha, y dañar las yemas basales, impidiendo su brotación en la siguiente temporada.



FIGURA 2.3. Brotes y sarmientos atacados por *B. cinerea*. Fuente: ITACYL.

En racimos, los síntomas durante la fase de floración-cuajado se manifiestan sobre las inflorescencias y en el raspón del racimo en forma de manchas de color marrón oscuro (FIGURA 2.4). Durante el envero-recolección, los frutos comienzan a presentar signos de un aspecto podrido, desarrollando sobre su superficie un moho grisáceo característico (FIGURA 2.5). Cuando el hongo invade un racimo recién formado puede causar su pasificación completa, y los residuos florales infectados pueden servir como foco para atacar otros racimos durante su maduración.



FIGURA 2.4. Inflorescencias atacadas por *B. cinerea*. Fuente: Alves Santos, 2024.



FIGURA 2.5. Granos atacados por *B. cinerea*. Fuente Alves Santos, 2024.

El impacto de esta enfermedad no solo implica la pérdida directa de producción, sino que afecta en sí a la calidad de los futuros vinos, los análisis sensoriales señalan una pérdida perceptible en la calidad organoléptica del vino a partir de un umbral tan bajo como el 5% de uvas botritizadas (Ky et al., 2012).

2.3. Métodos tradicionales de control de *Botrytis cinerea*

El control efectivo de la podredumbre por *Botrytis* se logra al interrumpir el desarrollo de la epidemia estacional, evitando así que la enfermedad se manifieste antes del periodo de cosecha. Los métodos de control se basan en interferir en el ciclo de *B. cinerea* o en modificar la vulnerabilidad del tejido huésped en la vid (Mundy et al., 2022).

La gestión integrada incluye la eliminación de hojas en las áreas donde se desarrollan los frutos, la reducción de densidad cerca de los racimos para facilitar la circulación de aire y el uso de productos antifúngicos en los periodos de floración y maduración. Las labores de mantenimiento del viñedo durante el invierno son cruciales para disminuir la presencia de *B. cinerea*. Estas tareas comprenden la poda de limpieza, la elección de los sarmientos o espolones que se conservarán para el siguiente ciclo y el control de la vegetación (que incluye el manejo de cubiertas vegetales), tratándose de procedimientos orientados a suprimir potenciales focos de infección (Díez Méndez et al., 2024).

2.3.1. Control químico

Durante las últimas seis décadas, el control de *B. cinerea* ha dependido principalmente del uso de fungicidas químicos, aplicados fundamentalmente como medida preventiva. Para optimizar su aplicación, se han desarrollado tres modelos predictivos de lucha preventiva: el modelo estándar, el modelo 15-15, y el modelo estado potencial de infección (EPI). La formulación y aplicación efectiva de estos modelos requiere conocer el clima, el parásito y la planta, ya que cada modelo especifica el momento óptimo para aplicar las medidas de control

(Barrios et al., 2004). Hasta el momento, ninguno ha demostrado ser lo suficientemente eficaz para anticipar los ataques de *B. cinerea*. Por esta razón, sigue utilizándose el denominado modelo estándar (Barrios, 2009).

En cuanto a la utilización de fungicidas, la normativa vigente de la Unión Europea (UE), Reglamento (CE) n° 1107/2009, establece un marco regulatorio para las materias activas, cuya autorización está condicionada a la evaluación de sus posibles riesgos.

La información presentada en la TABLA 2.1 corresponden a la disponible en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) a 13 de junio de 2025, incluyéndose únicamente los de carácter químico.

TABLA 2.1. Materias activas autorizadas en España por el MAPA para el control de *B. cinerea* en vid (uva de vinificación). Fuente: MAPA y Alves Santos, 2024.

Número Registro	Materia activa	Inscripción	Caducidad	Plazo de seguridad (días)
25829	CIPRODINIL 30% [EC] P/V	01/05/2007	31/10/2026	21
ES-00324	FENHEXAMIDA 50% [WG] P/P	01/01/2016	31/12/2030	14

2.3.2. Control biológico microbiano

El uso intensivo y repetido de fungicidas ha favorecido la aparición de cepas de *B. cinerea* resistentes, reduciendo su eficacia y evidenciando la necesidad de métodos alternativos. Esta problemática ha impulsado la búsqueda de estrategias más sostenibles y compatibles con marcos internacionales como la Política Agrícola Común (PAC) y los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (Díez Méndez et al., 2024).

Durante las últimas tres décadas, el control biológico microbiano ha emergido como una alternativa prometedora para el manejo de *B. cinerea* en viñedos (Fedele et al., 2020). Esta estrategia se basa en el empleo de microorganismos antagonistas —principalmente bacterias, levaduras y hongos beneficiosos— capaces de reducir la incidencia o severidad de la enfermedad mediante diversos mecanismos de acción. Entre estos mecanismos destacan la competencia por nutrientes y espacio, el antagonismo directo, la producción de metabolitos antifúngicos y la inducción de resistencia sistémica en la planta hospedadora (Mundy et al., 2022; Altieri et al., 2023a).

Los microorganismos antagonistas más estudiados para el biocontrol de *B. cinerea* incluyen especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea* (bacterias), *Candida*,

Metschnikowia, *Aureobasidium* (levaduras), y *Trichoderma* (hongos filamentosos), así como algunos oomicetos como *Pythium oligandrum* (Mundy et al., 2022).

Los estudios realizados hasta la fecha sobre la aplicación de microorganismos antagonistas contra *B. cinerea* en vid, se encuentran resumidos en la TABLA 2.2. Para esta compilación se han seleccionado únicamente investigaciones que especificaban la variedad de uva utilizada y que demostraron efectos significativos en la reducción de la incidencia o severidad de la enfermedad. Asimismo, se ha priorizado la inclusión de trabajos desarrollados en países de la Unión Europea, especialmente Italia y Francia, por su proximidad geográfica y similitud de condiciones climáticas con España.

Los microorganismos antagonistas evaluados, especialmente bacterias como *Bacillus ginsengihumi* Ten et al., 2007 y *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1888) Gavini et al., 1989, junto con levaduras como *Candida sake* (Saito & M.Ota) Uden & H.R.Buckley ex S.A.Mey. & Ahearn y diversas especies de hongos filamentosos, representan una opción prometedora para el control de *B. cinerea*. Su eficacia depende de la concentración aplicada y del método de inoculación empleado. Estos agentes de biocontrol actúan principalmente mediante tres mecanismos: la inducción de defensas vegetales, el desarrollo de resistencia sistémica en la planta, y el antagonismo directo contra el patógeno. No obstante, la efectividad para reducir la incidencia y severidad de la infección está condicionada por las condiciones ambientales y por la capacidad de estos microorganismos para establecerse, sobrevivir y persistir tanto en la superficie como en el interior de los órganos de la vid.

TABLA 2.2. Resumen de estudios de campo sobre la eficacia de microorganismos antagonistas contra *B. cinerea* en vid. Fuente: Basado en Díez Méndez et al., 2024.

Microorganismo		Dosis y aplicación	Variedad	Localización	Efecto	Mecanismo de acción	Referencia
Grupo microbiano	Especie						
Bacterias	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	150–200 mL de 1×10^8 UFC/mL en raíces/planta	Chardonnay	Francia	Reducción severidad	Resistencia sistémica inducida	Magnin-Robert et al., 2007
		Sumergir hojas en 1×10^7 UFC/mL			Reducción incidencia	Inducción de defensas locales	Trotel-Aziz et al., 2008
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2000 g/ha de 5×10^{10} UFC/g pulverizado sobre dosel	Merlot	Italia	Reducción incidencia y severidad	No identificado	Altieri et al., 2023b, 2024
		370 g/ha de 1×10^{10} UFC/g pulverizado sobre dosel					
	<i>B. ginsengihumi</i>	5×10^7 UFC/mL + aditivo Sticman pulverizado sobre racimos	Merlot	Francia	Reducción en un 75% incidencia	Competencia por nutrientes	Calvo Garrido et al., 2018
		5×10^7 UFC/mL + aditivo Sticman pulverizado sobre racimos	Semillon blanc Merlot noir	Francia	Reducción hasta 60% severidad	Antagonismo directo	Calvo Garrido et al., 2019
	<i>B. subtilis</i>	Sumergir hojas en 1×10^7 UFC/mL	Chardonnay	Francia	Reducción incidencia	Inducción de defensas locales	Trotel-Aziz et al., 2008
		3000 g/ha de $5,1 \times 10^{10}$ UFC/g pulverizado sobre dosel	Merlot	Italia	Reducción incidencia y severidad	No identificado	Altieri et al., 2023b, 2024
	<i>Pantoea agglomerans</i>	150–200 mL de 1×10^8 UFC/mL en raíces/planta	Chardonnay	Francia	Reducción hasta 60% severidad	Resistencia sistémica inducida	Magnin-Robert et al., 2007
		Sumergir hojas en 1×10^7 UFC/mL			Reducción incidencia	Inducción de defensas locales Antagonismo directo	Trotel-Aziz et al., 2008
<i>P. ananatis</i>	12 mL de 2×10^8 UFC/mL pulverizado sobre racimos/planta	Sauvignon Blanc	Austria	Reducción severidad	Competencia por el espacio	Gasser et al., 2012	

TABLA 2.2 (cont.). Resumen de estudios de campo sobre la eficacia de microorganismos antagonistas contra *B. cinerea* en vid. Fuente: Basado en Díez Méndez et al., 2024.

Microorganismo		Dosis y aplicación	Variedad	Localización	Efecto	Mecanismo de acción	Referencia
Grupo microbiano	Especie						
Bacterias	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	150–200 mL de 1×10^8 UFC/mL en raíces/planta	Chardonnay	Francia	Reducción severidad	Resistencia sistémica inducida	Magnin-Robert et al., 2007
		Sumergir hojas en 1×10^7 UFC/mL			Reducción incidencia	Inducción de defensas locales Antagonismo directo	Trotel-Aziz et al., 2008
Levaduras	<i>Aureobasidium pullulans</i>	400 g/ha de $2,5 \times 10^9$ UFC/mL pulverizado sobre dosel	Merlot	Italia	Reducción incidencia severidad	No identificado	Altieri et al., 2023b, 2024
	<i>Candida sake</i>	5×10^7 UFC/mL pulverizado sobre dosel	Cabernet Sauvignon	España	Reducción incidencia	Antagonismo directo	Cañamás et al., 2011
		5×10^7 UFC/mL + aditivo Fungicover pulverizado sobre racimos	Macabeo	España	Reducción severidad en un 85%	No identificado	Calvo Garrido et al., 2013
		5×10^7 UFC/mL + aditivo Fungicover pulverizado sobre racimos	Italia	Francia	Reducción severidad en un 85%	No identificado	Calvo Garrido et al., 2014
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	300–400 L/ha de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL pulverizado sobre dosel	Macabeo	España	Reducción incidencia en un 65% y severidad en un 85%	No identificado	Calvo Garrido et al., 2017
		$2,5 \times 10^7$ UFC/mL + aditivos: trehalosa, Fungicover, almidón de patata o maltodextrina pulverizado sobre dosel			Reducción incidencia y severidad	Antagonismo directo	Carbó et al., 2019
	<i>M. pulcherrima</i>	2000 g/ha de $1-3 \times 10^{10}$ UFC/g pulverizado sobre dosel	Merlot	Italia	Reducción incidencia y severidad	No identificado	Altieri et al., 2023b, 2024
3,33 L/planta de 1×10^{10} UFC/L pulverizado sobre dosel		Italia	Italia	Reducción incidencia y severidad en un 86%	No identificado	Lombardo et al., 2023	
3,33 L/planta de 1×10^{10} UFC/L pulverizado sobre dosel		Italia	Italia	Reducción incidencia y severidad en un 86%	No identificado	Lombardo et al., 2023	

Alumna: Francisca-Leke Díez Gutiérrez

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) - E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

TABLA 2.2 (cont.). Resumen de estudios de campo sobre la eficacia de microorganismos antagonistas contra *B. cinerea* en vid. Fuente: Basado en Díez Méndez et al., 2024.

Microorganismo		Dosis y aplicación	Variedad	Localización	Efecto	Mecanismo de acción	Referencia
Grupo microbiano	Especie						
Hongos filamentosos	<i>Trichoderma asperellum</i>	1000 g/ha de $1-3 \times 10^7$ UFC/g pulverizado sobre dosel	Merlot	Italia	Reducción incidencia y severidad	No identificado	Altieri et al., 2023b, 2024
	<i>T. atroviride</i>	200 g/ha de 1×10^{13} UFC/g pulverizado sobre dosel					
	<i>T. gamsii</i>	1000 g/ha de $1-3 \times 10^7$ UFC/g pulverizado sobre dosel					
Oomicetos	<i>Pythium oligandrum</i>	250 g/ha de 1×10^6 UFC/g pulverizado sobre dosel	Merlot	Italia	Reducción incidencia y severidad	No identificado	Altieri et al., 2023b, 2024

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

2.3.3. Otras alternativas para su control

Como se ha indicado en apartados anteriores, en lo relativo a los microorganismos antagonistas, los resultados favorables obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio habitualmente no han conseguido reproducirse en condiciones de campo.

Por otra parte, los productos naturales bioactivos (PNBs), clasificados como “sustancias básicas” según lo establecido en el Artículo 23 del Reglamento (CE) nº 1107/2009), presentan también inconvenientes relacionados con su estabilidad, solubilidad y falta de selectividad, factores que restringen significativamente su efectividad. Un enfoque para solventar estas limitaciones y optimizar la eficiencia de PNBs consiste en la implementación de técnicas de micro/nanoencapsulación que exhiban capacidad inhibitoria sobre la reproducción del patógeno (Stan et al., 2021).

La nanotecnología es una disciplina emergente dedicada a la elaboración, manipulación, caracterización y obtención de materiales a escala nanométrica, comprendida entre 1 y 100 nanómetros (Cerqueira et al. 2018). Esta disciplina proporciona metodologías sostenibles orientadas a incrementar la productividad de los cultivos mediante la inclusión de diversas aplicaciones tecnológicas, entre las que se encuentran nanopesticidas, nanofertilizantes, sistemas de nanorecubrimiento y de nanoencapsulación, además de técnicas que promueven la germinación de semillas y potencian los mecanismos de tolerancia frente a factores de estrés (Guleria et al., 2023). La TABLA 2.3 ilustra las aplicaciones y beneficios de algunos de los nanomateriales utilizados dentro del ámbito agrícola, detallándose su funcionalidad.

TABLA 2.3. Aplicaciones y beneficios de algunos nanomateriales aplicados a la agricultura sostenible. Fuente: Basado en Thakur y Yadav, 2025.

Tipo de nanomaterial	Función	Aplicaciones de destino	Beneficios	Ejemplos
Nanofertilizantes	Mejora absorción y liberación de nutrientes	Nutrición de cultivos	Aumenta la eficiencia de los nutrientes	Nanopartículas de N, P, K, Zn (liberación lenta)
Nanopesticidas	Liberación controlada y dirigida	Manejo de plagas	Reduce residuos y mejora la eficacia	Nanoencapsulado, aceites esenciales
Nanoherbicidas	Eliminar malezas sin dañar los cultivos	Control de malezas	Reduce el impacto ambiental	Nanopartículas de herbicidas específicas para cada objetivo
Nanobiosensores	Entrega dirigida de herbicidas y detección de enfermedades	Detección de enfermedades, monitoreo de suelos	Detección temprana de plagas y uso eficiente de los recursos	Sensores de pH, humedad y patógenos específicos
Nanopartículas antimicrobianas	Acción antimicrobiana	Protección contra enfermedades	Reduce el uso de pesticidas químicos	Nanopartículas de óxido de cobre, plata y zinc.
Inductores de inmunidad (nanoelicitores)	Fortalece las defensas de las plantas.	Resistencia a las enfermedades	Aumenta la resistencia	Óxido de zinc, nanopartículas de quitosano
Bioestimulantes encapsulados	Liberación a largo plazo de bioestimulantes	Salud del suelo y de las plantas	Mejora la diversidad microbiana y aumenta la producción	Extractos nanoencapsulados de algas marinas y ácidos húmicos

En lo que respecta al desarrollo y utilización de nanotransportadores (*nanocarriers*, NCs), la nanoencapsulación generalmente se define como el proceso de atrapar compuestos bioactivos dentro de nanopartículas con el propósito de facilitar su administración a localizaciones específicas dentro del organismo (Guleria et al., 2023) o, en el caso de aplicaciones agrícolas, para permitir la administración localizada y controlada de productos fitosanitarios y fertilizantes con objeto de mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos (Garde Cerdán et al., 2021). Las nanocápsulas son una categoría específica de los nanomateriales, caracterizadas por poseer uno o más componentes activos (núcleo) y una matriz protectora (cubierta) en cuyo interior puede albergarse el ingrediente activo (Mondéjar López et al., 2024). Las ventajas principales que ofrece esta tecnología comprenden la liberación prolongada y continua, el incremento en la selectividad y eficiencia del componente bioactivo, la mejora de su biodisponibilidad, así como la disminución de la toxicidad del producto. Las cubiertas de las nanocápsulas pueden fabricarse empleando una extensa gama de materiales, incluyendo polímeros, lípidos, fosfolípidos o sílice. La TABLA 2.4 resume sus ventajas e inconvenientes, y la TABLA 2.5 recoge otras propiedades altamente deseables en el diseño de NCs.

Entre esta diversidad de nanopartículas, las matrices biopoliméricas han atraído un especial interés durante los últimos años (Machado et al., 2022) por su biocompatibilidad y sostenibilidad ambiental (Mondéjar López et al., 2024). De hecho, polímeros de origen natural como el quitosano (36%), el alginato (23%) y las proteínas de origen vegetal (16%), son las alternativas más investigadas para el desarrollo de NCs, seguidas de los polímeros sintéticos (35%) y los materiales inorgánicos (Pinto et al., 2022).

TABLA 2.4. Ventajas e inconvenientes de los principales tipos de NCs empleados en el ámbito agrícola. Fuente: Adaptado de Vega Vásquez et al., 2020, con actualizaciones de Machado et al., 2022.

Tipo de nanotransportador	Ventajas	Inconvenientes
Basados en silicio mesoporoso	Estructura estable y liberación controlada de la carga	Inorgánico, no biodegradable y pueden causar lisis celular
Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)	Mejoran la solubilidad de bioactivos hidrofóbicos y son biodegradables. Producción relativamente barata	Baja capacidad de carga, baja eficiencia de encapsulación y riesgo de liberación anticipada
Nanoemulsiones	Altamente estables y adecuadas para bioactivos lipofílicos, además de ser biodegradables y económicas	Gran cantidad de surfactante para lograr tamaño nanométrico
Dendrímeros	Permiten la entrega dirigida de bioactivos y la incorporación de cargas lipofílicas o lipofóbicas	Presenta citotoxicidad
Nanocristales	Mejoran la biodisponibilidad y adhesividad de los bioactivos sin necesidad de portadores	Producción costosa, requiere disolventes y equipos especializados
Hidrogeles	Biocompatibles, ecológicos, económicos y fáciles de fabricar	Presentan variabilidad en su formulación
Biopoliméricos	Biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo costo y baja toxicidad ambiental	Carga y eficiencia de encapsulación variable

TABLA 2.5. Características de un NC ideal para la agricultura. Fuente: Adaptado de Vega Vásquez et al., 2020.

Condiciones de fabricación	Propiedades de encapsulación	Perfil de lanzamiento
Condiciones suaves	Estable	Controlado
Escalable	Sin liberación/fuga anticipada de la carga	Dirigido
Bajo costo	No tóxico	Sensible a estímulos (pH, luz, temperatura)
Reproducibile	Biodegradable	
Baja variabilidad	Soluble en agua	

La nanotecnología posee un potencial enorme para revolucionar la agricultura mediante la mejora de la precisión, la sostenibilidad y la productividad, facilitando el desarrollo de prácticas agrícolas más económicas, ecológicas y sostenibles que trascienden el simple aumento de la producción. No obstante, su implementación a gran escala se enfrenta a limitaciones significativas que incluyen la falta de normas regulatorias (el rápido avance tecnológico obstaculiza el establecimiento de mecanismos de control apropiados por parte de los organismos reguladores), los altos costos (especialmente para pequeños agricultores), la

incertidumbre sobre su eficacia en distintas condiciones, y la complejidad que supone su incorporación a los sistemas agrícolas tradicionales (Thakur y Yadav, 2025).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

La hipótesis del presente Trabajo Fin de Máster parte de la premisa de que la encapsulación de productos naturales bioactivos (PNBs) en nanotransportadores (*nanocarriers*, NCs) puede ser una tecnología habilitadora para el control de *B. cinerea* en viñedos, redundando en una mayor eficiencia en el control del estrés biótico, sin perjuicio en la producción de vino, y contribuyendo a la sostenibilidad de la industria vitivinícola en su conjunto.

En consonancia con los principios de la agricultura sostenible, el objetivo principal de este proyecto es la evaluación de la eficacia de NCs biopoliméricos como plataforma no tóxica y ecológica para la vehiculización y liberación controlada de productos bioactivos de origen natural para la protección de la vid frente a *B. cinerea*, sin que se vea afectada la calidad final del vino producido.

Este objetivo general se desglosa en 4 objetivos específicos:

1. Optimizar la encapsulación de PNBs en nanotransportadores basados en quitosano previamente desarrollados por la Universidad de Valladolid.
2. Evaluar la eficacia *in vitro* y *ex situ* de los NCs cargados con PNBs.
3. Ensayar la eficacia *in vivo* de los NCs cargados con PNBs en condiciones de campo.
4. Analizar el impacto de los tratamientos ensayados sobre la calidad del mosto.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y aislados fúngicos

El quitosano de alto peso molecular (n° CAS 9012-76-4) fue adquirido de Hangzhou Simit Chem. & Tech. Co. (Hangzhou, China). La enzima NeutrasedTM 0,8 L fue suministrada por Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca). El cianurato de melamina (n° CAS 37640-57-6; >99,0%) se adquirió de Nachmann Srl (Milán, Italia). La quitosanasa de *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman y Henrici (EC 3.2.1.132; n° CAS 51570-20-8), el ácido acético (n° CAS 64-19-7; 80% en H₂O), el anhídrido metacrílico (MA, n° CAS 760-93-0; ≥94%), el hidróxido de calcio (n° CAS 1305-62-0; 99,995% en base a metales traza), el ácido fosfórico (n° CAS 7664-38-2; reactivo ACS, ≥85% en peso en H₂O), el metanol (UHPLC, apto para espectrometría de masas; n° CAS 67-56-1), y el tetrahidrofurano (THF, n° CAS 109-99-9; ≥99,9%) y Tween[®]20 (n° CAS 9005-64-5) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). La solución de hidróxido de amonio (n° CAS 1336-21-6, solución acuosa al 50% v/v) fue suministrada por Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EE. UU.). Becton, Dickinson, and Company (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) suministró el caldo de dextrosa de patata (PDB) y el agar de dextrosa de patata (PDA).

El aislado fúngico de *Botrytis cinerea* utilizado en este estudio fue el CECT 20973, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). El aislado se mantuvo en PDA a 4 °C y se repicó cada dos meses.

4.2. Material vegetal y preparación de los extractos a encapsular

Las raíces de *Rubia tinctorum* L. (FIGURA 4.1) utilizadas para la preparación del extracto bioactivo se recogieron en las orillas del río Carrión, a su paso por la ciudad de Palencia (España). Los detalles de la preparación y caracterización del extracto hidrometanólico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) son los descritos en trabajos previos (Langa Lomba et al., 2021). Los análisis se realizaron en los Servicios de Apoyo a la Investigación (STI) de la Universidad de Alicante, empleando un cromatógrafo 7890A acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar 5975C (ambos de Agilent Technologies).

FIGURA 4.1. Raíces de *R. tinctorum*.

Las muestras de corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. (FIGURA 4.2) empleadas para la preparación de los extractos proceden de La Merced (Chanchamayo, Perú). Para extraer los polifenoles y otros compuestos bioactivos de interés presentes en la corteza de *U. tomentosa*, se optó por la digestión en una solución acuosa de amoníaco, de acuerdo a la metodología detallada en Sánchez Hernández et al. (2022b). El extracto se caracterizó por GC-MS.

FIGURA 4.2. Ejemplar de *U. tomentosa*.

Los racimos de uva “Tempranillo” y “Verdejo” utilizados en los ensayos *ex situ* fueron suministrados por Bodegas Beronia (Rueda, Valladolid, España) perteneciente a la empresa González Byass S.A. (Jerez de la Frontera, Cádiz, España).

4.3. Preparación oligómeros de quitosano (COS), nitruro de carbono grafitico (g-C₃N₄) e hidroxiapatito (HAp)

Los oligómeros de quitosano (COS) se prepararon según el procedimiento descrito en Santos Moriano et al. (2017), pero con modificaciones, utilizando la preparación proteolítica comercial Neutrase™ para degradar las cadenas poliméricas de quitosano y formar un producto enriquecido en quitoooligosacáridos desacetilados.

En base al método propuesto por Dante et al. (2013), las nanohojas de alta pureza de g-C₃N₄ se obtuvieron mediante pirólisis a 600 °C de cianurato de melamina bajo atmósfera de aire durante 50 min.

Para obtener partículas finas de polvo HAp, se utilizó una solución de H_3PO_4 con $Ca(OH)_2$, siguiendo el procedimiento descrito en Kim y Saito (2001) con ligeras modificaciones en las condiciones de ultrasonificación.

4.4. Síntesis de los nanotransportadores

La preparación del nanotransportador COS-g- C_3N_4 se realizó conforme a lo descrito en Santiago Aliste et al. (2022) y en la patente española ES2958909 (patente internacional WO 2024/018098 A1). La síntesis de quitosano metacrilado se realizó según el procedimiento propuesto por Gupta y Gupta (2022), pero con modificaciones: la metacrilación de COS se realizó mediante la adición de 420 mg de oligómeros que se dispersaron en una solución de anhídrido metacrílico (MA) en tetrahidrofurano (THF), que se obtuvo dispersando 0,5 mL de MA ($\rho = 1,035 \text{ g/cm}^3$) en 25 mL de THF.

La mezcla se sonicó durante 5 min (distribuidos en periodos de 1 min) utilizando un ultrasonicador tipo sonda (modelo UIP1000hdT; 1000 W, 20 kHz; Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania). La especie química co-encapsulante fue una forma porosa de g- C_3N_4 , resultante del ataque de 210 mg de g- C_3N_4 con MA en THF (0,5 mL en 25 mL). La solución de g- C_3N_4 metacrilado se añadió gota a gota a la solución de COS metacrilado, tras lo cual se sonicó durante 5 min (distribuidos en periodos de 1 min) para obtener una relación en peso de COS:g- C_3N_4 de 1:0,5.

Adicionalmente, de forma análoga, se preparó otro NC añadiendo HAp al complejo inicial COS-g- C_3N_4 , obteniéndose el NC COS-Hap-g- C_3N_4 . La síntesis se realizó conforme al procedimiento propuesto por Santiago Aliste et al. (2023) y descrito en la solicitud de la patente española P202330435 (WO 2024/246386 A1), partiendo de 105 mg de g- C_3N_4 .

La solución de HAp metacrilado se añadió lentamente a la solución de COS metacrilado, tras lo cual se ultrasonicó y agitó durante 30 min. Posteriormente, también se añadió gradualmente a esta mezcla la solución de g- C_3N_4 metacrilado, se ultrasonicó y agitó. La solución resultante se agitó durante 24 h, se centrifugó, se lavó repetidamente con agua Mili-Q® para eliminar el exceso de MA y se liofilizó, obteniendo una relación en peso de COS:HAp:g- C_3N_4 de 2:1:0,5.

4.5. Encapsulación y liberación de los extractos

Para la encapsulación del extracto de *R. tinctorum* en el nanotransportador de COS-g-C₃N₄, se añadieron 105 mg del extracto liofilizado a la solución del NC para obtener una relación en peso COS:g-C₃N₄:*R. tinctorum* de 1:0,5:0,25. La mezcla se sometió a sonicación durante 1 h en periodos de 5 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 60 °C y el pH entre 4-5 (Santiago Aliste et al., 2022).

Para la encapsulación del extracto de *U. tomentosa* en el nanotransportador de COS-HAp-g-C₃N₄, se redisolvió 210 mg del extracto liofilizado en metanol y se añadieron a la solución del NC, dando como resultado una relación en peso de COS:HAp:g-C₃N₄:*U. tomentosa* de 2:1:0,5:1. La mezcla se sometió a sonicación durante 1 hora en intervalos de 10 minutos, manteniendo una temperatura por debajo de 60 °C y un pH de 4-5 (Santiago Aliste et al., 2023).

Para conocer las interacciones entre los extractos vegetales y la matriz polimérica se establecieron dos parámetros asociados a las propiedades de los NCs, la eficiencia de encapsulación (EE) y la eficiencia de liberación (ER).

Respecto a la eficiencia de encapsulación (EE) del extracto vegetal se determinó utilizando un método indirecto propuesto por Fisher et al. (2019) (Ec. 4.1), calculando la diferencia entre la cantidad inicial de extracto y el extracto no encapsulado presente en el sobrenadante después de la centrifugación.

$$EE(\%) = \frac{m(\text{extracto inicial}) - m(\text{extracto no encapsulado})}{m(\text{extracto inicial})} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

La eficiencia de liberación (ER) se evaluó midiendo la cantidad de extracto liberado después de la degradación enzimática de los NCs utilizando quitosanasas. Se calculó como el porcentaje del extracto liberado en relación con la cantidad total de extracto encapsulado en los NCs.

4.6. Caracterización de los nanotransportadores

Los nanotransportadores, tanto vacíos como cargados con extractos de plantas, se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX),

espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X en polvo (DRX), como se describe en estudios anteriores (Santiago Aliste et al., 2022, 2023).

La caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó con un microscopio JEM 1011 HR (JEOL; Akishima, Tokio, Japón), siendo las condiciones de operación: 100 kV y aumentos de 25 000 a 120 000×. Las micrografías se obtuvieron con una cámara CCD GATAN ES1000W (4000×2672 píxeles). Para la tinción negativa de las muestras se utilizó acetato de uranilo al 2 %.

La composición multielemental de los NC, antes y después de la carga con el producto natural bioactivo (PNB) fue analizada por SEM-EDX utilizando un equipo EVO HD 25 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Los espectros infrarrojos de los subproductos antes de realizar la extracción y de los extractos liofilizados se registraron utilizando un espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) modelo Nicolet iS50 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.), equipado con un sistema de reflexión total atenuada (ATR). Los espectros se recogieron en el intervalo 400–4000 cm^{-1} con una resolución espectral de 1 cm^{-1} , promediando 64 barridos.

La composición de fases de las muestras se caracterizó mediante un difractómetro D8 Advance (Bruker; Billerica, MA, EE. UU.), equipado con una fuente de rayos X Cu K- α ($\lambda = 0,15406$ nm). El patrón de difracción de rayos X en polvo (DRX) se registró en el rango $2\theta = 5 - 70^\circ$.

4.7. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro

Para determinar la actividad antifúngica de ambos tipos de nanotransportadores cargados con los extractos vegetales, junto con las de los extractos en su forma libre (a modo de comparación), frente a *B. cinerea* se utilizó el método de dilución en agar, conforme con los procedimientos estándar de prueba de susceptibilidad antifúngica EUCAST (Arendrup et al., 2012). Las soluciones madre de los tratamientos se incorporaron al medio PDA para alcanzar concentraciones que van desde 62,5 a 1500 $\mu\text{g/mL}$. Los tapones de micelio fúngico (5 mm de diámetro) de los márgenes de cultivos PDA de una semana se transfirieron a placas que contenían las concentraciones predeterminadas para cada tratamiento.

Se prepararon tres placas por combinación de tratamiento/concentración, con dos réplicas cada una. Las placas se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 1 semana. El control negativo consistió en medio PDA puro. El crecimiento radial del micelio se evaluó como la media de dos diámetros de colonia perpendiculares entre sí para cada repetición. Se determinó la inhibición del crecimiento (Ec. 4.2) utilizando la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(d_c - d_t)/d_c] \cdot 100 \quad (\text{Ec. 4.2})$$

donde d_c y d_t representan el diámetro medio de la colonia del control no tratado y la colonia fúngica tratada, respectivamente.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración más baja del compuesto ensayado que produce una inhibición completa del crecimiento fúngico visible.

4.8. Preparación de la suspensión de conidios fúngicos

Las suspensiones de conidios fúngicos se prepararon como se ha descrito en Sánchez Hernández et al. (2023). Los conidios se obtuvieron de cultivos de PDB de 5 días de *B. cinerea*. Tras la filtración a través de dos capas de muselina estéril para eliminar los micelios somáticos, se determinó la concentración de esporas con un hemocitómetro (Weber Scientific International Ltd., Teddington, Middlesex, Reino Unido) y se ajustó a 1×10^6 esporas (conidios)/mL.

4.9. Ensayos de protección *ex situ*

La eficacia de los tratamientos en racimos, en condiciones controladas de laboratorio, se determinó mediante inoculación artificial en uvas de las variedades “Tempranillo” y “Verdejo”, adaptando la metodología descrita por Buzón Durán et al. (2023). Se seleccionaron racimos de tamaño, color y forma uniforme para garantizar lotes homogéneos, confirmándose previamente la ausencia de lesiones en todos ellos. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Al inicio de las pruebas, las uvas se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 min, seguido de tres lavados consecutivos con agua esterilizada destilada y finalmente se secaron en una campana de flujo laminar utilizando papel absorbente estéril. En este punto, se separaron las uvas de control negativo (sin hongo y sin tratamiento). Posteriormente, los racimos de uva se rociaron con los respectivos tratamientos (es decir, COS-g-C₃N₄-R. *tinctorum* y COS-HAp-g-C₃N₄-U. *tomentosa*) a concentraciones de CMI, CMI×2 y CMI×3. Una vez secos, se hicieron cortes de 2 mm en las bayas con un alfiler

entomológico estéril, que luego se inocularon con 10 μL de la suspensión de conidios 1×10^6 conidios/mL. Algunas uvas no tratadas se reservaron para cortes y adición de conidios, usándolas como controles positivos (con hongo y sin tratamiento).

Las uvas se almacenaron en una cámara a 22 °C con una humedad relativa del 90 %, creando así un ambiente óptimo para el desarrollo de *B. cinerea*. La progresión de la infección fúngica se monitorizó durante un período de 12 días, empleando una escala con valores 0 a 4, donde 0 = sin síntomas visibles; 1 = síntomas leves (manchas pequeñas); 2 = síntomas moderados (manchas que cubren hasta el 25 % del fruto); 3 = síntomas graves (25-50 % del fruto afectado); y 4 = síntomas muy severos (>50 % de la baya afectada o colonización completa).

4.10. Ensayos de campo

Los ensayos de campo se realizaron en viñedos de variedad “Tempranillo” (la variedad más susceptible) de la bodega Dominio Fournier (coordenadas: 426206 m E, 4616982 m N, zona 30, Berlangas de Roa, Burgos, España; FIGURA 4.3a), perteneciente a la D.O.P. Ribera de Duero.

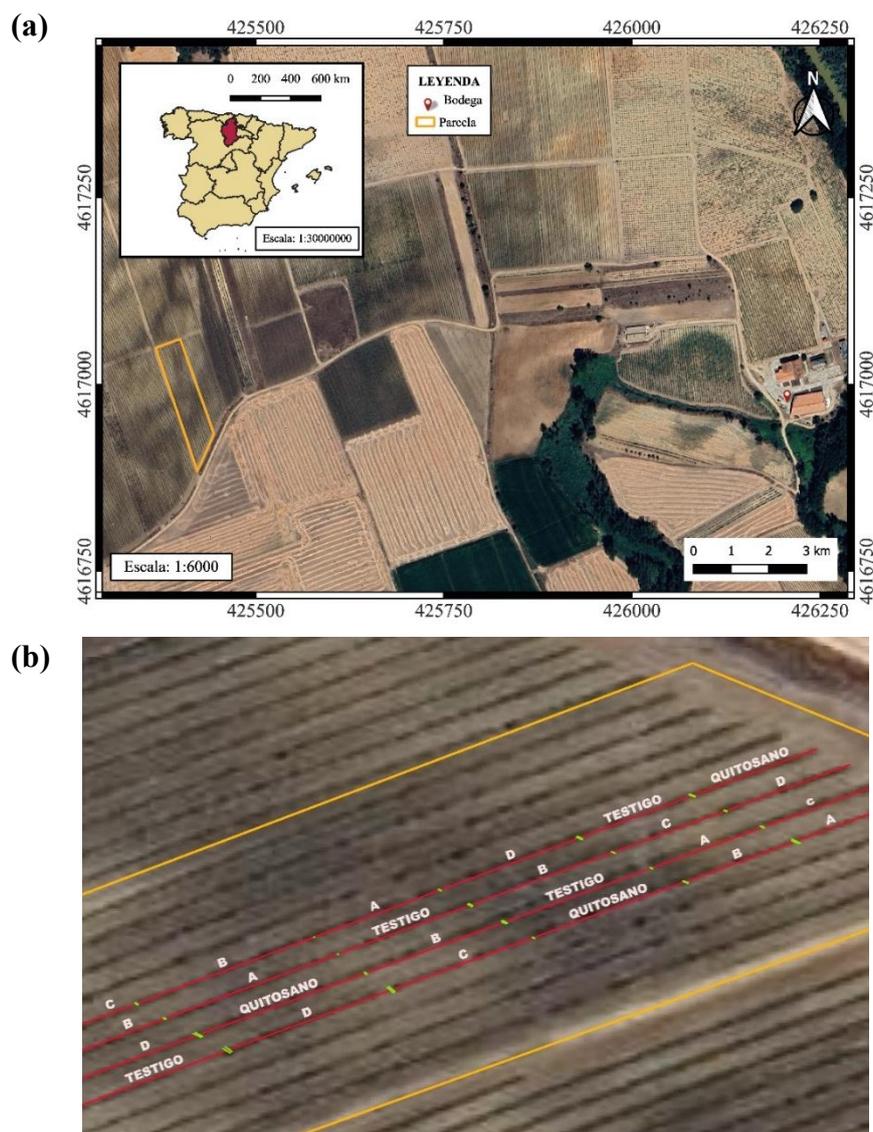


FIGURA 4.3. **(a)** Localización de la bodega Dominio Fournier en el Término Municipal de Berlangas de Roa, Burgos (marcador en color rojo, coord. $41^{\circ}42'04''N$ $3^{\circ}53'12''W$) y de la parcela de estudio (borde naranja, coord. $41^{\circ}42'05''N$ $3^{\circ}53'47''W$); **(b)** Distribución de los tratamientos en las líneas de cultivo según un diseño aleatorizado. A,B,C,D corresponden a los tratamientos COS-g- C_3N_4 -*R. tinctorum*, COS-HAp-g- C_3N_4 -*U. tomentosa*, extracto de *R. tinctorum* y extracto de *U. tomentosa*, respectivamente. En color verde se indica la posición aproximada de las cepas de guarda. Fuente: Elaboración propia a partir de QGIS.

Se utilizó un diseño de bloque completo aleatorizado (FIGURA 4.3b), ensayando tanto los extractos no encapsulados como los tratamientos encapsulados, a una dosis $CMI \times 3$, junto con clorhidrato de quitosano comercial 2,5 % (SANCO 12388/2013; Alltech Spain, Almaguera, Guadalajara, España) y un control sin tratar.

Las aplicaciones se realizaron utilizando un pulverizador de mochila a batería (ref:VIPU16BB1), con 10 plantas por repetición y 4 repeticiones por tratamiento, para un total

de 40 plantas por tratamiento (FIGURA 4.4a,b). Los tratamientos se asignaron aleatoriamente dentro de cada bloque para minimizar los efectos de los gradientes ambientales en el viñedo. Las aplicaciones tuvieron lugar el 21 de septiembre de 2024 y el 28 de septiembre de 2024 (FIGURA 4.4c) y la vendimia se realizó el 4 de octubre de 2024 (FIGURA 4.4d).



FIGURA 4.4. (a) Preparación de los tratamientos. (b) Tratamientos a aplicar. (c) Aplicación del tratamiento por pulverización. (d) Vendimia. Fuente: Elaboración propia.

La severidad de la infección por *B. cinerea* en racimos de uvas se evaluó utilizando la metodología estandarizada de evaluación visual de Hill et al. (2010). Para cada tratamiento, se evaluaron 100 racimos (25 racimos por repetición \times 4 repeticiones) en el momento de la cosecha (4 de octubre de 2024). La severidad se estimó determinando visualmente el porcentaje de área visible de cada racimo afectado por *B. cinerea*, considerando exclusivamente las áreas con esporulación evidente. Se utilizó una clave de evaluación de la severidad similar a la descrita por Hill et al. (2010) para ayudar en la precisión de las evaluaciones visuales, con imágenes de referencia que muestran 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % y 90 % del área infectada.

Para cada tratamiento, la severidad media se calculó promediando los valores de severidad de todos los racimos evaluados. La eficacia de cada tratamiento (Ec. 4.3) se calculó utilizando la fórmula de Abbott:

$$\text{Eficacia (\%)} = \left[\frac{\text{severidad en control} - \text{severidad en tratamiento}}{\text{severidad en el control}} \right] \cdot 100 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

4.11. Vinificación del mosto

La vinificación del mosto se llevó a cabo en colaboración con el Centro Tecnológico Agrario y Alimentario (ITAGRA.CT). Las uvas se trasladaron a las instalaciones de laboratorio en el mismo día que fueron cosechadas para proceder con la producción de vino tinto. La

preparación del mosto se realizó mediante el despalillado de aproximadamente 10 kilogramos de uvas por cada tratamiento (COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum*, COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa*, extracto *R. tinctorum*, extracto *U. tomentosa*, quitosano y control sin tratar). El material obtenido tras el despalillado de cada tratamiento (volumen aproximado de 4 L) se distribuyó en botellones de fermentación con capacidad de 5 L. Se procedió al muestreo de cada unidad experimental para efectuar la caracterización química del mosto. Seguidamente, se adicionaron los compuestos enológicos requeridos, aplicando los protocolos establecidos por la bodega de referencia:

- Metabisulfito potásico; dosis de 35 mg/L de mosto
- Tanino elágico (castaño), dosis 5g/100kg
- Enzimas para la extracción de color; 2g/100kg
- Polisacáridos; 30g/hL

A continuación, se homogeneizó el contenido de cada botellón y se almacenaron en cámara aclimatada a 8 °C. Transcurridos tres días (7 de octubre de 2024), se adicionó nutriente orgánico a razón de 20 g/hL por unidad experimental, complementado con la inoculación de levaduras comerciales en concentración de 20 g/hL. Simultáneamente, se elevó la temperatura del sistema a 20 °C para establecer las condiciones óptimas de fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica dio comienzo ese mismo día, coincidiendo con la inoculación de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen. Se implementó un sistema de control y seguimiento diario del proceso fermentativo basado en mediciones diarias de densidad y temperatura del mosto. Esta metodología de monitorización continua hasta la finalización del proceso fermentativo, con el propósito de evaluar la progresión del consumo de azúcares y controlar la cinética fermentativa.

El día 9 de octubre de 2024 se incorporaron bacterias lácticas *Oenococcus oeni* (Garvie, 1967) Dicks et al., 1995 (2,5 g/hL) a cada tratamiento. Las condiciones de temperatura se mantuvieron constantes a 20 °C hasta completar ambos procesos fermentativos: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica.

La operación de prensado se ejecutó el día 16 de octubre sobre la pasta de cada uno de los tratamientos. El vino resultante fue trasegado a recipientes de menor volumen, asegurando que quedase completamente lleno para minimizar el riesgo de picado acético y oxidación.

Posteriormente, se ajustó la concentración de anhídrido sulfuroso a 40 mg/L en cada muestra. Finalmente, se extrajeron muestras representativas de los vinos obtenidos para proceder a su caracterización analítica.

En diciembre de 2024 se procedió al primer trasiego con el objetivo de separar las lías de sedimentación más gruesas, seguido del ajuste del contenido de anhídrido sulfuroso a 30 ppm. El protocolo incluyó trasiegos en los meses de febrero y abril. Cada operación de trasiego fue seguida por la adición de sulfitos hasta una concentración final de 30 ppm, almacenándose los vinos bajo condiciones de refrigeración controlada a 8 °C.

A continuación, se detallan las metodologías analíticas empleadas para la determinación de los principales parámetros fisicoquímicos en las muestras de mosto:

Determinación del pH: El pH se determinó mediante un potenciómetro o pH-metro debidamente calibrado con soluciones tampón patrón (pH 4,00 y 7,00). La muestra de mosto se agitó suavemente y se mantuvo a temperatura ambiente (20 ± 1 °C). El electrodo se introdujo directamente en la muestra y se registró el valor una vez estabilizada la lectura.

Acidez total: La acidez total se determinó mediante una valoración ácido-base utilizando una disolución de hidróxido sódico (NaOH 0,1 N). Se pipetearon 20 mL de mosto y se valoraron con hidróxido sódico hasta alcanzar un $\text{pH} = 7$ en la disolución, indicando el punto de equivalencia. La acidez se expresó en g/L de ácido tartárico.

Ácido málico: La cuantificación del ácido málico se llevó a cabo mediante un método enzimático basado en la acción de la enzima malato deshidrogenasa (MDH), que cataliza la conversión de L-malato a oxalacetato en presencia de NAD^+ , con formación de NADH. La producción de NADH se midió por espectrofotometría a 340 nm, y su concentración se calculó mediante una curva de calibración con patrones conocidos.

NFA (Nitrógeno Fácilmente Asimilable): Se cuantificó mediante un ensayo enzimático basado en la glutamato deshidrogenasa, en presencia de NADPH. La reacción implica la conversión de 2-oxoglutarato en glutamato, con oxidación de NADPH, monitorizada a 340 nm. El NFA representa la fracción de nitrógeno disponible para la levadura y se compone principalmente de iones amonio (NH_4^+).

GAP (Grado alcohólico Probable): Para su determinación rápida y sencilla se utilizó un refractómetro manual, el cual mide el índice de refracción del mosto, que está directamente relacionado con la concentración de azúcares solubles, principalmente glucosa y fructosa. El refractómetro convierte este valor en una escala específica como grado alcohólico probable.

Grado Baumé: El grado Baumé se determinó mediante un mostímetro o densímetro de Baumé, introducido en una probeta cilíndrica que contenía el mosto. Se leyó la escala a temperatura corregida (20 °C) y el resultado se expresó en °Bé. Este valor es indicativo de la concentración de azúcares en el mosto, y su lectura se expresa como densidad g/L del mosto.

4.12. Análisis estadístico

Para comparar la eficacia de los tratamientos en los ensayos *in vitro* y *ex situ* se empleó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una comparación de medias *post hoc* mediante la prueba HSD de Tukey con un valor de significancia de 0,05 ($p \leq 0,05$), dado que se cumplieron los requisitos de homogeneidad y homocedasticidad según las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático IBM SPSS Statistics v.25 (IBM; Armonk, NY, EE.UU).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de los extractos vegetales

La composición fitoquímica de los extractos de *R. tinctorum* y *U. tomentosa* fue determinada por GC-MS, tal como se describe en los estudios de Langa Lomba et al. (2021) y Sánchez Hernández et al. (2022b).

El análisis fitoquímico del extracto hidrometanólico de raíz de *R. tinctorum* reveló tres grupos principales de metabolitos secundarios (FIGURA 5.1). Las antraquinonas representaron la fracción mayoritaria, siendo la 2-metil-9,10-antracenediona el compuesto más representativo de esta familia. Los compuestos fenólicos constituyeron el segundo grupo más abundante, destacando el 2-metoxi-4-(1-propenil)fenol como componente principal. Finalmente, las ciclopentenonas representaron una fracción menor, con la 2-hidroxi-2-ciclopentenona como compuesto identificado (Langa Lomba et al., 2021).

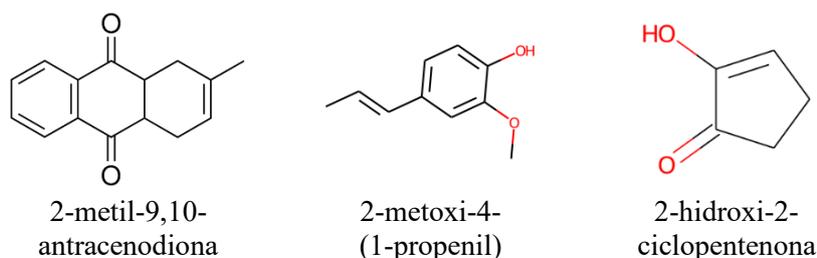


FIGURA 5.1. Principales fitoquímicos identificados en el extracto hidrometanólico de la raíz de *R. tinctorum*.

Entre los fitoquímicos del extracto de corteza de *U. tomentosa* predominaron tres metabolitos secundarios (FIGURA 5.2). El isobutirato de n-octilo constituyó el compuesto mayoritario. Le siguió en importancia el 19 α -metil-2-oxoformosano-16-carboxilato de metilo, mientras que el 2-metil-tetrahidrotiofeno representó una fracción menor del extracto analizado (Sánchez Hernández et al., 2022b).

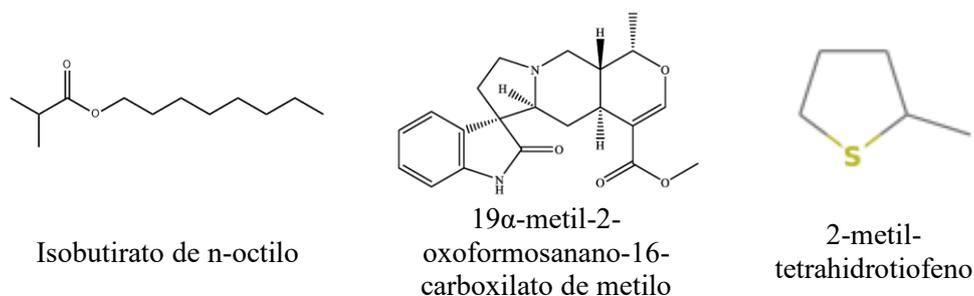


FIGURA 5.2. Principales fitoquímicos identificados en el extracto de corteza de *U. tomentosa*.

5.2. Caracterización de los nanotransportadores

La caracterización detallada de ambos NCs ha sido referida previamente en los estudios de Santiago Aliste et al. (2022, 2023).

El análisis por microscopía electrónica de transmisión de los NCs de COS-g-C₃N₄ (FIGURA 5.3) reveló partículas de morfología esférica con un diámetro promedio de $85,5 \pm 21,3$ nm y un índice de dispersidad de 0,25. Por su parte, los NCs de COS-HAp-g-C₃N₄ (FIGURA 5.4) exhibieron un diámetro ligeramente superior $250 \pm 84,4$ nm con un índice de dispersidad de 0,34. Ambos sistemas presentaron características de monodispersidad.

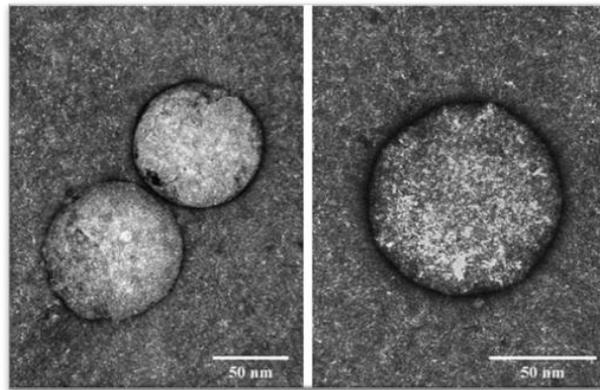


FIGURA 5.3. Micrografías TEM de NCs de COS-g-C₃N₄: vacíos (izquierda) y cargados con extracto de *R. tinctorum* (derecha). Fuente: Santiago Aliste et al., 2022.

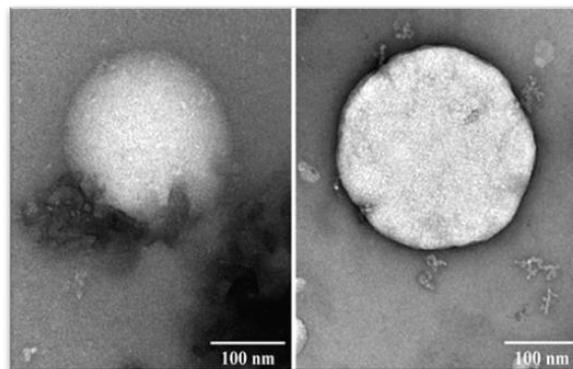


FIGURA 5.4. Micrografías TEM de NCs de COS-HAP-g-C₃N₄: vacío (izquierda) y cargado con extracto de *U. tomentosa* (derecha). Fuente: Santiago Aliste et al., 2023.

La eficiencia de encapsulación del extracto de *R. tinctorum* alcanzó valores entre 95 % y el 97 %, resultando en una relación en peso COS:g-C₃N₄:*R. tinctorum* de 1:0,5:0,25. En cambio, el extracto de *U. tomentosa* presentó una eficiencia de encapsulación más baja (del 82 %), con una relación en peso COS:HAp:g-C₃N₄:*U. tomentosa* de 2:1:0,5:1.

La eficiencia de liberación tras degradación enzimática con quitosanasa fue del 74-81 % para el extracto de *R. tinctorum* y del 84-89 % para el extracto de *U. tomentosa*.

5.3. Actividad antifúngica *in vitro*

Los resultados de las pruebas de inhibición del crecimiento micelial se representan gráficamente mediante un diagrama de barras (FIGURA 5.5). A partir de estos resultados se determinaron las CMI para cada tratamiento evaluado.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) determinadas para los extractos vegetales no encapsulados y los NCs cargados con extractos vegetales frente a *B. cinerea* se muestran en la TABLA 5.1. Con el objetivo de comparar la eficacia antifúngica de los extractos encapsulados respecto a sus formas libres, se calcularon CMI equivalentes considerando las proporciones en peso de cada extracto vegetal en las respectivas formulaciones de NCs (aproximadamente 14,3% para *R. tinctorum* y 22,2% para *U. tomentosa*).

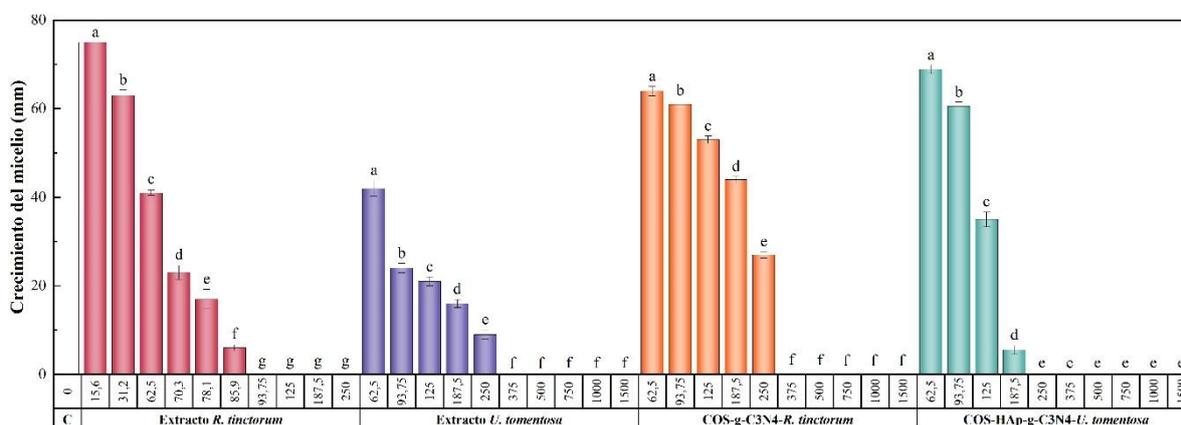


FIGURA 5.5. Inhibición del crecimiento micelial obtenida con los NCs cargados con extractos de *R. tinctorum* y *U. tomentosa* frente a *B. cinerea* a concentraciones entre 15,6/62,5 y 1500 µg/mL. Las barras de error representan desviaciones estándar. Las mismas letras encima de las concentraciones indican que no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

TABLA 5.1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI, µg/mL) de los extractos vegetales no encapsulados y de las formulaciones de NCs frente a *B. cinerea*. Los valores entre paréntesis indican la concentración equivalente del extracto vegetal encapsulado correspondiente a la CMI del NC.

Tratamiento	Extracto <i>R. tinctorum</i>	Extracto <i>U. tomentosa</i>	COS-g-C ₃ N ₄ - <i>R. tinctorum</i>	COS-HAp-g- C ₃ N ₄ - <i>U. tomentosa</i>
CMI	93,75	375	375 (53,6)	250 (55,6)

Los resultados revelan que tanto los extractos libres como los NCs cargados exhiben una actividad antifúngica significativa contra *B. cinerea*. Al comparar las concentraciones equivalentes de extracto en los NCs con sus homólogos no encapsulados, se evidenció una

mejora notable en la eficacia antifúngica, particularmente para el extracto de *U. tomentosa*, donde la CMI equivalente disminuyó sustancialmente de 375 µg/mL en forma libre a 55,6 µg/mL cuando fue nanoencapsulado. Si bien el extracto de *R. tinctorum* también mostró mayor eficacia al ser encapsulado (53,6 µg/mL frente a 93,75 µg/mL en forma libre), esta mejora resultó menos marcada que la observada para *U. tomentosa*.

5.4. Protección de las uvas *ex situ*

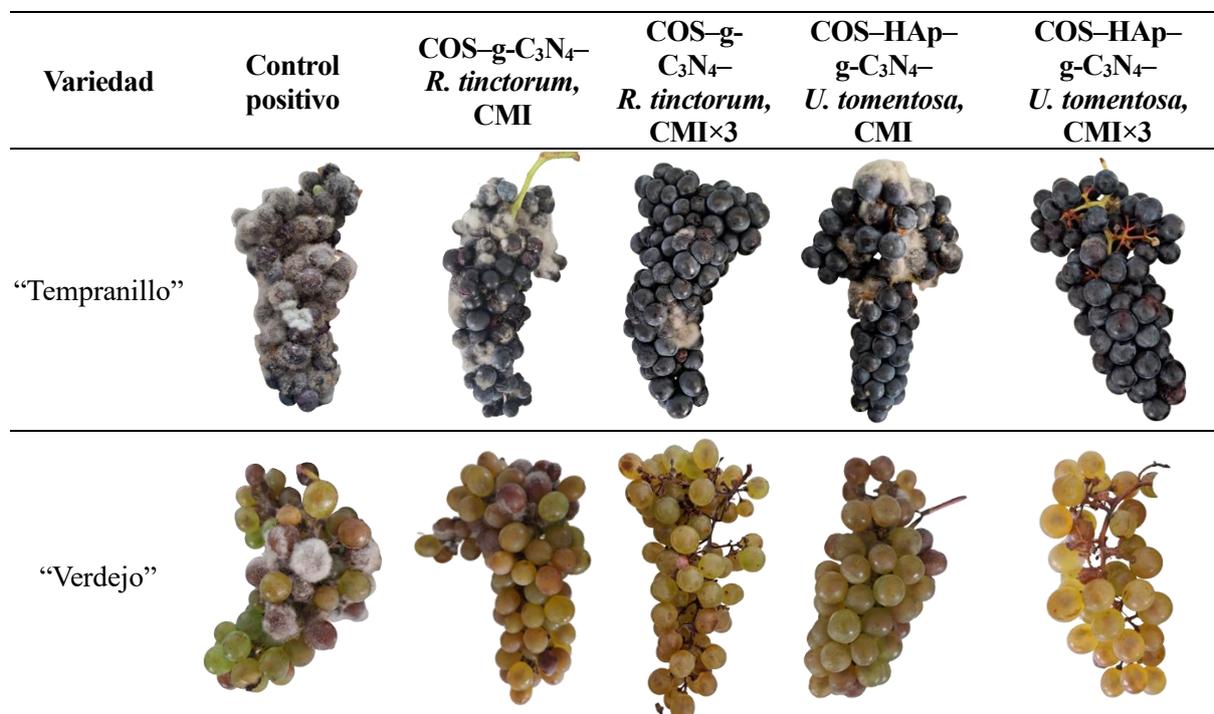
Los resultados de los ensayos *ex situ* de efectividad en uvas “Tempranillo” y “Verdejo” se presentan en la TABLA 5.2. La progresión de la infección fúngica se evaluó a los 2, 5, 7 y 12 días posteriores a la inoculación.

Es importante señalar que incluso las uvas del control negativo, sin inoculación artificial de *B. cinerea*, desarrollaron progresivamente síntomas de moho gris durante el período experimental. Aunque el procedimiento de desinfección superficial con NaOCl al 3 % resultó eficaz para reducir la carga fúngica externa, no eliminó las infecciones latentes establecidas profundamente en el tejido, características de las condiciones naturales del viñedo. Esta observación evidencia la naturaleza ubicua de *B. cinerea* en los entornos vitícolas y la dificultad para eliminar completamente las infecciones naturales, incluso bajo condiciones experimentales controladas. La diferencia observada entre los controles negativos y positivos confirma la presión infectiva adicional derivada de la inoculación artificial, validando así el enfoque experimental.

TABLA 5.2. Severidad de la infección por *B. cinerea* en uvas “Tempranillo” y “Verdejo” tratadas con diferentes formulaciones. Los datos representan medias de mínimos cuadrados de los valores de severidad (escala 0-4) evaluados en distintos días tras la inoculación.

Tratamiento	“Tempranillo”				“Verdejo”			
	Día 2	Día 5	Día 7	Día 12	Día 2	Día 5	Día 7	Día 12
Control negativo	0,333 a	1,333 ab	2,333 ab	3,667 ab	0,000 a	0,000 b	0,667 ab	3,333 a
Control positivo	0,667 a	2,667 a	3,667 a	4,000 a	0,000 a	0,667 ab	1,667 ab	4,000 a
COS-g-C ₃ N ₄ - <i>R. tinctorum</i> , MIC	0,333 a	1,333 ab	2,333 ab	4,000 a	0,333 a	1,333 a	2,333 ab	4,000 a
COS-g-C ₃ N ₄ - <i>R. tinctorum</i> , MIC×2	0,333 a	1,333 ab	2,333 ab	4,000 a	0,000 a	0,333 ab	1,333 ab	4,000 a
COS-g-C ₃ N ₄ - <i>R. tinctorum</i> , MIC×3	0,000 a	0,667 b	0,667 b	3,333 ab	0,333 a	0,333 ab	0,333 b	3,333 a
COS-HAp-g-C ₃ N ₄ - <i>U. tomentosa</i> , MIC	0,667 a	1,000 b	2,333 ab	4,000 a	0,333 a	0,667 ab	2,667 a	4,000 a
COS-HAp-g-C ₃ N ₄ - <i>U. tomentosa</i> , MIC×2	0,000 a	0,667 b	1,333 b	4,000 a	0,000 a	0,000 b	0,667 ab	4,000 a
COS-HAp-g-C ₃ N ₄ - <i>U. tomentosa</i> , MIC×3	0,000 a	0,333 b	1,333 b	3,000 b	0,000 a	0,000 b	1,000 ab	3,667 a
Pr > F(Modelo)	0,401	0,003	0,002	0,002	0,661	0,029	0,012	0,086
Significancia	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No

La FIGURA 5.6, muestra fotos representativas de racimos de uva “Tempranillo” y “Verdejo” tras el tratamiento con diferentes formulaciones y concentraciones e inoculación con *B. cinerea*.

FIGURA 5.6. Imágenes representativas de racimos de uva “Tempranillo” (hilera superior) y “Verdejo” (hilera inferior) a los 7 días de la inoculación con *B. cinerea*, sin tratamiento y con los tratamientos a distintas concentraciones.

En las uvas de variedad “Tempranillo” se detectaron diferencias significativas entre tratamientos a partir del día 5. Al séptimo día, tanto el tratamiento COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* a una concentración de CMI×3 como el tratamiento COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* a las concentraciones CMI×2 y CMI×3 exhibieron una severidad de ataque significativamente menor comparada con el control positivo. Al cabo de 12 días, únicamente el tratamiento COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* a una concentración de CMI×3 mantuvo una severidad significativamente menor que el control positivo. En la variedad “Verdejo”, las diferencias significativas se registraron en los días 5 y 7 (no en el 12). El día 7, el tratamiento COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* a una concentración de CMI×3 mostró la menor severidad de ataque.

En conjunto, los ensayos *ex situ* demostraron que ambos NCs proporcionaron protección contra *B. cinerea* durante las fases iniciales de la infección, con mejores resultados a concentraciones elevadas (CMI×3). Sin embargo, al día 12, la mayoría de los tratamientos mostraron niveles de infección similares a los del control positivo, lo que sugiere que el efecto protector se redujo progresivamente a lo largo del tiempo, por lo que sería necesaria más de una aplicación de tratamiento.

5.5. Ensayos de campo

La FIGURA 5.7 muestra la eficacia de los NCs objeto de estudio en la protección de uvas “Tempranillo” frente a la podredumbre gris, en comparación con el control no tratado, en los ensayos de campo realizados en los viñedos de Dominio Fournier. La evaluación cuantitativa se recoge en la TABLA 5.3.



FIGURA 5.7. Efecto protector frente a la podredumbre gris mediante aplicación por pulverización de NCs de COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* (izquierda) y de COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* (centro) en uvas “Tempranillo” frente al control no tratado (derecha).

TABLA 5.3. Severidad de la infección por *B. cinerea* (% de área afectada) en racimos de uva 'Tempranillo' tras la aplicación en campo de diferentes tratamientos y su eficacia.

Tratamiento	Control sin tratar	Extracto <i>R. tinctorum</i>	Extracto <i>U. tomentosa</i>	Quitosano comercial	COS-g-C ₃ N ₄ - <i>R. tinctorum</i>	COS-HAp-g-C ₃ N ₄ - <i>U. tomentosa</i>
Incidencia (%)	80	40	35	37	25	18
Eficacia (%)	-	50,0	56,3	53,8	68,8	77,5

Los resultados mostraron que la totalidad de los tratamientos redujeron significativamente la severidad de la infección por *B. cinerea* en comparación con el control no tratado. No obstante, las formulaciones nanoencapsuladas ofrecieron una protección superior, siendo COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* el que mostró la mayor efectividad (77,5 %) contra la podredumbre del racimo. El tratamiento COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* también exhibió efectos protectores notables, con una eficacia del 68,8 %.

Los extractos vegetales en su forma libre y el quitosano comercial proporcionaron una protección moderada contra la infección. En concreto, Los extractos de *U. tomentosa* y *R. tinctorum* alcanzaron valores de efectividad del 56,3 % y 50,0 %, respectivamente, mientras que el quitosano comercial mostró una efectividad equiparable (53,8 %) a la de los extractos no encapsulados. Estos resultados confirman que la nanoencapsulación de extractos vegetales se traduce en mejoras notables de eficacia frente a la aplicación de los extractos en forma libre y frente a sustancias básicas utilizadas actualmente en el sector vitivinícola.

5.6. Influencia de los tratamientos sobre la calidad del mosto

Los resultados del análisis fisicoquímico de los parámetros enológicos para la caracterización del mosto se resumen en la TABLA 5.4. Se observaron diferencias notables en las principales propiedades enológicas entre los seis tratamientos evaluados. Aunque la limitación a una única repetición por tratamiento no permite realizar análisis estadísticos, sí es posible realizar una interpretación descriptiva que permita identificar tendencias y comportamientos diferenciados entre los tratamientos ensayados.

TABLA 5.4. Características fisicoquímicas del mosto en función del tratamiento.

Parámetro	COS-g-C ₃ N ₄ - <i>R. tinctorum</i>	COS-HAp-g-C ₃ N ₄ - <i>U. tomentosa</i>	Extracto <i>R.</i> <i>tinctorum</i>	Extracto <i>U. tomentosa</i>	Quitosano comercial	Control sin tratar
pH	4,10	4,19	4,22	4,02	4,22	4,03
Acidez total (g/L)	3,23	3,80	3,60	4,14	3,58	3,68
Ácido málico (g/L)	2,37	3,22	2,98	3,26	2,98	2,92
NFA	285	328	295	304	342	258
°Beaume (g/L)	13,80	12,70	13,10	13,00	13,30	12,30
GAP (% vol.)	14,09	13,40	13,90	13,80	14,30	12,80

Los valores de pH oscilaron entre 4,02 (extracto de *U. tomentosa*) y 4,22 (extracto de *R. tinctorum* y quitosano comercial). El valor de pH más bajo para el tratamiento con extracto *U. tomentosa* es coherente con su elevada acidez total (4,14 g de ácido tartárico/L).

La acidez total también mostró una notable variabilidad, con valores comprendidos entre 3,23 g/L (COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum*) y 4,14 g/L (extracto de *U. tomentosa*). Esta variación de aproximadamente un 28 % entre extremos sugiere diferencias potenciales en la expresión sensorial de los futuros vinos. El perfil de ácido málico siguió un patrón similar al de la acidez total, con concentraciones que oscilaron entre 2,37 g/L (tratamiento COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum*) y 3,26 g/L (extracto de *U. tomentosa*). Es preciso señalar que tanto el extracto de *U. tomentosa* libre como su forma encapsulada (COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa*) fueron los que presentaron las concentraciones más elevadas (3,26 y 3,22 g/L, respectivamente).

Respecto al nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), la concentración más elevada correspondió al tratamiento con quitosano (342 mg/L), seguido del

COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* (328 mg/L), mientras que el nivel más bajo fue el asociado al control sin tratar (258 mg/L), lo que puede conducir a fermentaciones lentas o incompletas.

Los parámetros relacionados con el contenido en azúcares mostraron que el tratamiento COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* alcanzó el mayor grado Baumé (13,80 °Bé), seguido del tratamiento basado en quitosano comercial (13,3 °Bé). El indicador GAP fue coherente, con valores máximos en los tratamientos con quitosano y COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* (14,30 y 14,09, respectivamente).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Comparativa de la eficacia de los extractos sin encapsular

Los valores de CMI determinados en el presente trabajo constituyen un parámetro fundamental para evaluar la eficacia relativa frente a otros extractos naturales previamente ensayados contra *B. cinerea*. Si bien las comparaciones con concentraciones efectivas requieren considerarse con precaución, pues las diferencias metodológicas pueden afectar significativamente los valores de CMI, el análisis bibliográfico presentado en la TABLA 6.1 proporciona el contexto necesario para valorar adecuadamente la eficacia de los tratamientos objeto de este TFM.

Los extractos de *R. tinctorum* y *U. tomentosa* mostraron una actividad antifúngica significativa frente a *B. cinerea*, con valores de CMI de 93,75 y 375 µg/mL, respectivamente. En concreto, el extracto de *R. tinctorum* mostró una eficacia comparable a la de los aceites esenciales más activos descritos en investigaciones previas, que solo sería menor que la identificada por Abou-Jawdah et al. (2004) para un extracto de *Origanum syriacum* L. (CMI = 60 µg/mL), seguido de *Origanum vulgare* L. (CE₅₀ = 50 µg/mL) y *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link (CE₅₀ = 83 µg/mL) (Daferera et al., 2003). En comparación con otros extractos, el extracto de *R. tinctorum* superó ampliamente la actividad reportada para *Mentha ×piperita* L. (CMI = 0,50-0,75 µL/mL) y *Cymbopogon martini* (CMI = 0,25-0,50 µL/mL) (Oliveira Filho et al., 2021). Por su parte, el extracto de *U. tomentosa*, aunque no alcance la efectividad tan alta, si fue superior a la de muchos de productos naturales previamente evaluados, como los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (CMI = 600-1200 µg/mL) (Šernaitė et al., 2020a) y los extractos de algas de *Anabaena* sp. (CMI = 2500 µg/mL) (Righini et al., 2019). Los dos extractos ensayados serían considerablemente más activos que los de *Allium sativum* L. (CMI = 20.000 µg/mL), reconocido como “sustancia básica”, o *Achillea millefolium* L. (CMI > 20.000 µg/mL) (Şesan et al., 2015).

La elevada actividad antifúngica observada, especialmente en el caso de *R. tinctorum*, posiciona estos extractos como opciones prometedoras para su incorporación en sistemas de nanoencapsulación orientados al control de *B. cinerea* en viticultura. Esta estrategia ofrecería ventajas adicionales en términos de estabilidad y reproducibilidad en comparación con los aceites esenciales, que presentan problemas de alta volatilidad y variabilidad en la concentración, asociada a las metodologías de extracción empleadas (Kasmi et al., 2024).

TABLA 6.1. Concentraciones efectivas/valores de CMI (expresados en $\mu\text{g/mL}$) descritos en la bibliografía para otros productos naturales bioactivos (EP = extracto de planta; AE= aceite esencial) frente a *Botrytis cinerea*. Fuente: Basado en Sánchez Hernández et al., 2022b, con actualizaciones.

Producto natural	Concentración efectiva /CMI	Ref.	
Extracto de raíz de <i>Rubia tinctorum</i>	CMI = 93,75	Este trabajo	
Extracto de corteza de <i>Uncaria tomentosa</i>	CMI = 375		
<i>Rosmarinus officinalis</i> AE	CE ₅₀ ($\mu\text{L/mL}$) <0,25-7,62	Kasmi et al., 2024	
<i>Salvia officinalis</i> AE	CE ₅₀ ($\mu\text{L/mL}$) <0,25-0,96		
<i>Coriandrum sativum</i> EP	CMI = 1600	Dènè et al., 2023	
<i>C. sativum</i> AE	CMI = 600-1200		
<i>Mentha piperita</i> AE	CMI ($\mu\text{L/mL}$) = 0,50-0,75	Oliveira Filho et al., 2021	
<i>Cymbopogon martini</i> AE	CMI ($\mu\text{L/mL}$) = 0,25-0,50		
<i>Cinnamomum camphora</i> AE	CMI ($\mu\text{L/mL}$) = 0,75-0,10		
<i>M. spicata</i> AE	CMI ($\mu\text{L/mL}$) = 0,25-0,50		
<i>Syzygium aromaticum</i> EP	CMI = 600	Šernaitė et al., 2020a	
<i>S. aromaticum</i> AE	CMI = 1200		
<i>L. nobilis</i> EP	CMI > 2000		
<i>L. nobilis</i> AE	CMI > 2000		
<i>Rosmarinus officinalis</i> EP	CMI > 2000		
<i>R. officinalis</i> AE	CMI > 2000		
<i>Pimenta dioica</i> EP	CMI = 2200		Šernaitė et al., 2020b
<i>Cinnamomum cassia</i> EP	CMI = 600		
<i>Laurus nobilis</i> EP	CMI = 3000		
<i>Anabaena</i> sp.	CMI = 2500	Righini et al., 2019	
<i>Ecklonia</i> sp.	CMI = 5000		
<i>Jania</i> sp.	CMI = 10.000		
<i>Achillea millefolium</i>	CMI > 20.000	Şesan et al., 2015	
<i>Allium sativum</i>	CMI = 20.000		
<i>Artemisia dracunculus</i>	CMI > 20.000		
<i>Hyssopus officinalis</i>	CMI < 5000		
<i>Mentha</i> sp.	CMI = 20.000		
<i>R. officinalis</i>	CMI > 20.000		
<i>Satureja hortensis</i>	CMI = 10.000		
<i>Tagetes patula</i>	CMI > 20.000		
<i>Valeriana officinalis</i>	CMI > 20.000		
<i>Origanum vulgare</i> AE	CE ₅₀ = 50		Daferera et al., 2003
<i>Thymus capitatus</i> AE	CE ₅₀ = 83		
<i>O. dictamnus</i> AE	CE ₅₀ = 67		
<i>O. majorana</i> AE	CE ₅₀ = 143		
<i>Lavandula angustifolia</i> AE	CE ₅₀ = 223		
<i>R. officinalis</i> AE	CE ₅₀ = 606		
<i>Salvia fruticosa</i> AE	CE ₅₀ ≤ 1000		
<i>M. pulegium</i> AE	EC ₅₀ = 216		
<i>Micromeria nervosa</i> EP	CMI = 500	Abou-Jawdah et al., 2004	
<i>Origanum syriacum</i> EP	CMI = 60		
<i>Inula viscosa</i> EP	CMI > 2 × 10 ⁶		
<i>Plumbago maritime</i> EP	CMI = 1 × 10 ⁶		
<i>O. heracleoticum</i> EP	CMI > 5 × 10 ⁵	Salamonet et al., 2006	
<i>Salvia officinalis</i> EP	CMI > 5 × 10 ⁵		
<i>R. officinalis</i> EP	CMI > 5 × 10 ⁵		
Corteza de <i>Pinus sylvestris</i>	CMI = 20.000	Minova et al., 2015	
Corteza de <i>P. abies</i>	CMI = 20.000		
<i>Liquidambar orientalis</i> EP	CMI > 4 × 10 ⁵	Onaran y Bayan, 2016	
<i>Myrtus communis</i> EP	CMI = 400		

6.2. Comparativa de la eficacia de los extractos encapsulados

Una comparación directa de la actividad antifúngica de los NCs ensayados en este TFM con otros sistemas de NCs basados en quitosano identificados en estudios previos para el control del fitopatógeno estudiado (TABLA 6.2) debe ser interpretada con precaución, puestos que estos últimos no han evaluado extractos naturales como ingrediente activo encapsulado.

No obstante, los resultados obtenidos demuestran que los NCs objeto de estudio presentan una eficacia competitiva frente a otros sistemas recogidos en trabajos previos para el control de *B. cinerea*: en ensayos *in vitro*, las formulaciones COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* (CMI = 375 µg/mL) y COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* (CMI = 250 µg/mL) mostraron actividades antifúngicas comparables a otros NCs basados en quitosano. Entre estos se incluyen las nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial de cáscara de *Pistacia atlantica* Desf. (CMI = 20 µg/mL) (Hesami et al., 2021), las nanoesferas de quitosano/PVA con aceite esencial de *Salvia officinalis* L. (CMI = 0,16-0,40 µL/mL) (Erarslan et al., 2023), y el nanocomplejo de quitosano con aceite esencial de *Hyssopus officinalis* L. que logró un 85 % de inhibición a 2 mg/mL (Hadidi et al., 2021).

Otros NCs no basados en quitosano también han demostrado altas eficacias (TABLA 6.3) destacando las nanopartículas de lignina con piraclostrobina (CE₅₀ = 0,951 µg/mL) (Liu et al., 2024) y el DZ@ZIF-8 con dazomet (CE₅₀ = 7,9 µg/mL) (Ren et al., 2022).

Respecto a la eficacia en condiciones *ex situ*, en este TFM, la formulación COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* logró el control del ataque hasta el día 12 en “Tempranillo”, mientras que COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* exhibió mayor eficacia en “Verdejo” (día 7). Estos resultados son consistentes con estudios similares realizados en otros frutos, como las nanopartículas de quitosano con aceite esencial de *Zataria multiflora* Boiss., que redujeron la tasa de infección al 16,67 % en fresas (Mohammadi et al., 2015), y las nanopartículas de caseína con eugenol, que alcanzaron una incidencia del 23 % en peras después de 8 días (Xue et al., 2019). Estos hallazgos sugieren que la eficacia de los NCs depende de múltiples factores, entre los que se encuentran la matriz del NC, el ingrediente activo encapsulado y el tipo de fruto tratado.

TABLA 6.2. NCs basados en quitosano descritos en la bibliografía para el control de *Botrytis cinerea*. Fuente: Basado en Santiago Aliste et al., 2023, con actualizaciones.

Tipo de nanotransportador	Ingrediente activo encapsulado	Eficiencia de encapsulación	Tipo de ensayo	Actividad	Ref.
NCs de quitosano	Extracto <i>R. tinctorum</i>	95-97%	<i>In vitro, ex situ, e in vivo</i>	<i>In vitro</i> : 375 µg/mL <i>Ex situ</i> : CMI×3 <i>In vivo</i> (uvas “tempranillo”): eficacia 68,8%	Este trabajo
	Extracto <i>U. tomentosa</i>	82%	<i>In vitro, ex situ, e in vivo</i>	<i>In vitro</i> : 250 µg/mL <i>Ex situ</i> : CMI×3 <i>In vivo</i> (uvas “tempranillo”): eficacia 77,5%	
NPs de quitosano	cital, cicoprozanol y cital:cicoprozanol (1:1-1:2)	89-98%	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : < 1,56-25 µg/mL	Bence et al., 2024
N-succinilquitosano	BTL-11 (molécula bioactiva antifúngica)	80%	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : 60,1% (encapsulado) y 30% (libre) a 10 µg/mL	Zhou et al., 2024
Hidrogeles de quitosano/PVA basados en nanopartículas lipídicas sólidas	AE de <i>Oreganum vulgare</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	n.a.	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : inhibición entre 71,7 y 80,9% al 15%-18,7% v/v	Fincheira et al., 2024
Nanoesferas de quitosano/PVA	AE de <i>Salvia officinalis</i>	66,1-73,3%	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : CMI = 0,16-0,40 µL/mL para 0,25%, 0,5%, y 1% v/v de AE de salvia	Erarslan et al., 2023
NPs de quitosano	D-limoneno	89,4-92,3%	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i> : activación de la respuesta inmune de la planta (<i>Arabidopsis thaliana</i>) a 250 µg/mL @quitosano y 5 mg/mL D-limoneno	Vega Vásquez et al., 2021
Nanocomplejo de quitosano y aislado de proteína de guisante	AE de <i>Hyssopus officinalis</i>	n.a.	<i>In vitro y ex situ</i>	<i>In vitro</i> : inhibición del 85% a 2 mg/mL <i>Ex situ</i> (fresas): 12,2% de infección el día 8 a 2 mg/mL; 0,8 severidad de la enfermedad (vs. 4,3 para control) el día 9	Hadidi et al., 2021
NPs de quitosano	AE de cáscara de <i>Pistacia atlantica</i>	43,3-61,5%	<i>In vitro y ex situ</i>	<i>In vitro</i> : CMI = 20 µg/mL. <i>Ex situ</i> (fresas): 23,4% de infección el día 10 a 20 µg/mL	Hesami et al., 2021
NPs de quitosano	AE de <i>Zataria multiflora</i>	3,2-45%	<i>In vitro y ex situ</i>	<i>In vitro</i> : CMI = 1500 µg/mL <i>Ex situ</i> (fresas): tasa de infección del 16,67% el día 9 a 1500 µg/mL; 1,5 severidad de la enfermedad (vs. 4,9 para control)	Mohammadi et al., 2015

AE: aceite esencial; CMI: concentración mínima inhibitoria (µg/mL); NCs: nanotransportadores; NPs: nanopartículas; n.a.: no hay actividad.

TABLA 6.3. Otros tipos de NCs descritos en la bibliografía para el control de *Botrytis cinerea*. Fuente: Basado en Santiago Aliste et al., 2023, con actualizaciones.

Tipo de nanotransportador	Ingrediente activo encapsulado	Eficiencia de encapsulación	Tipo de ensayo	Actividad	Ref.
NPs de lignina	Piraclostrobina	86,15%	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : CE ₅₀ = 0,951 µg/mL	Liu et al., 2024
NPs de ácido poliláctico-co-glicólico	Pterostilbeno	37-75%	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : 25% a 20 µg/mL después de 72 h	De Angelis et al., 2022
NPs de caseína	Eugenol	67,1-90,4%	<i>In vitro</i> y <i>ex situ</i>	<i>In vitro</i> : CMI = 40,2 µg/mL de eugenol <i>Ex situ</i> (peras): 23 y 45% de incidencia de la enfermedad después de 8 y 12 días, respectivamente	Xue et al., 2019
β-glucanos y lecitina de soja	Resveratrol	67-94%	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : inhibición del 50-70% a 100 µg/mL	Salgado et al., 2015
Compuestos de inclusión de β-ciclodextrina (CD) dispersos en una película de polietileno de baja densidad (PEBD)	Carvacrol y trans-cinamaldehído	61-92%	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : actividad fungicida del 31,4 y 10, 9% para PEBD dopado con 1 wt% of β-CD-carvacrol or β-CD-cinamaldehído, respectivamente	Canales et al., 2019
Nanoesponjas basadas en ciclodextrina	1-metilciclopropeno *	n.a.	<i>Ex situ</i>	<i>Ex situ</i> (flores cortadas): inhibición del 40% a 0,25 µL/L después de 11 días	Seglie et al., 2012
Nanopartículas lipídicas sólidas	Citral y cicoprozanol Citral:Cicoprozanol (1:1-1:2)	n.a.	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : 6,25-50 µg/mL	Bence et al., 2024
Nanoliposomas	Lecitina:Nano-ZnO (5:1-25:1 <i>p/p</i>)	n.a.	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : CMI =10,67-30,19 µg/mL	Souri et al., 2024
NPs de CuO (CH@CuO)	Quitosano (recubrimiento)	n.a.	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> : CE ₉₂ = 250 µg/mL	Ismail et al., 2023
Nanocápsulas de <i>nanorods</i> de ZnO@OAm	Geraniol	33-78%	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	<i>In vitro</i> : CE ₅₀ = 150 µg/mL para la relación 1:3 ZnO:geraniol <i>In vivo</i> (plantas de tomate y pepino): índice de enfermedad de 3 (vs. 6 para control) en pepino y 4 (vs. 7 para control) en tomate después de 96 h	Tryfon et al., 2023
NPs de sílice mesoporosas	Eugenol (encapsulado) y Ag ⁺ (polidopamina coordinada como recubrimiento)	n.a.	<i>In vitro</i> , <i>ex situ</i> , e <i>in vivo</i>	<i>In vitro</i> : inhibición del 47,92% y 71,38% a 30 y 60 µg/mL, respectivamente <i>Ex situ</i> (hojas de tomate desprendidas): 72,59% y 82,63% a 60 y 120 µg/mL, respectivamente <i>In vivo</i> (hojas de tomate en maceta): alta protección en ambas dosis	Wang et al., 2022

Alumna: Francisca-Leke Díez Gutiérrez

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) - E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

TABLA 6.3 (cont.). Otros tipos de NCs descritos en la bibliografía para el control de *Botrytis cinerea*. Fuente: Basado en Santiago Aliste et al., 2023, con actualizaciones.

Tipo de nanotransportador	Ingrediente activo encapsulado	Eficiencia de encapsulación	Tipo de ensayo	Actividad	Ref.
NPs de sílice mesoporoso modificados con sal de amonio cuaternario con carboxilatopillar-5-areno	Clorhidrato de berberina	n.a.	<i>In vitro, ex situ, e in vivo</i>	<i>In vitro</i> : 36,20 y 48, 36% a 60 y 120 µg/mL, respectivamente <i>Ex situ</i> (hojas de tomate desprendidas): 45,47 y 52,71% a 60 y 120 µg/mL, respectivamente, después de 54 h <i>In vivo</i> (hojas de tomate en maceta): alta inhibición	Wang et al., 2021
NPs @ZIF-67	Boscalid *	18% de carga	<i>In vitro e in vivo</i>	<i>In vitro</i> : CE ₉₀ = 17,6 µg/mL <i>In vivo</i> (hojas de cítricos): inhibición completa a dosis más bajas que la de Boscalid no encapsulado	Zhang et al., 2022
imidazolato-8 zeolítico (DZ@ZIF-8)	Dazomet *	4,4% contenido de carga	<i>In vitro e in vivo</i>	<i>In vitro</i> : CE ₅₀ = 7,9 µg/mL <i>In vivo</i> (hojas de pepino en maceta): eficacia del 75% después de 10 días, superior a la del Dazomet (52%)	Ren et al., 2022
Liposomas recubiertos de quitosano y goma arábica	5I-1H-indol *	92%	<i>In vitro y ex situ</i>	<i>In vitro</i> : CMI = 25 µg/mL <i>Ex situ</i> (fresas, uvas Kyoho y mandarinas): alta protección a 200 µg/mL	Raj et al., 2021
NPs de fenhexamida y polihexametilen biguanida	Fenhexamida *	n.a.	<i>In vitro e in vivo</i>	<i>In vitro</i> : CE ₅₀ = 3,26 µg/mL <i>In vivo</i> (tomate): cierta protección a 1700 µg/mL	Tang et al., 2021

CE₅₀: concentración efectiva media (µg/mL); CE₉₀: concentración efectiva en un 90 % (µg/mL); CE₉₂: concentración efectiva en un 92 % (µg/mL); CMI: concentración mínima inhibitoria (µg/mL); NPs: nanopartículas; n.a.: no hay actividad; * fungicida convencional.

En comparación con estos sistemas, los NCs COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* y COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* presentan CMI's intermedias, pero demuestran eficacia controlada en condiciones *ex situ* en las dos variedades de uva, lo que sugiere potencial para aplicaciones específicas en viticultura. Las diferencias observadas entre variedades ("Tempranillo" vs "Verdejo") evidencia la importancia de considerar las características varietales en el desarrollo de estrategias de control basadas en nanotecnología.

6.3. Mecanismo de actuación

En este estudio se emplearon dos tipos de NCs, el primero basado en la combinación de oligómeros de quitosano (COS) como biopolímero y nitruro de carbono grafitico (g-C₃N₄) como material inorgánico. El segundo sistema se obtuvo mediante la incorporación de hidroxiapatito (HAp) al complejo anterior.

El quitosano presenta varias propiedades atractivas, que se analiza en la revisión de Maluin y Hussein (2020), incluyendo actividad antimicrobiana, antiviral, antifúngico, antioxidante entre otras. En el caso de los NCs basados en quitosano, este componente contribuye a la actividad antimicrobiana global mediante diversos mecanismos, incluyendo la alteración de las membranas celulares fúngicas, la quelación de nutrientes esenciales y la inhibición de la germinación de esporas (Ma et al., 2017). Esta acción sinérgica entre los extractos vegetales encapsulados y COS, que poseen propiedades antimicrobianas intrínsecas complementarias a los compuestos bioactivos, probablemente contribuye a la eficacia observada en los sistemas desarrollados.

La inclusión de g-C₃N₄ contribuye a la administración controlada del producto bioactivo al ofrecer baja toxicidad, excelente biocompatibilidad, encapsulación eficiente del compuesto activo (debido a su gran área superficial) y un efecto positivo en la liberación (Rajabzadeh-Khosroshahi et al., 2022). Adicionalmente, la incorporación de HAp se justifica por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y bioactividad demostradas en sistemas biológicos. El HAp ha sido utilizada exitosamente como vehículo de administración de antibióticos, fármacos anticancerígenos, ácidos nucleicos y proteínas, gracias a su alta relación superficie-volumen y actividad superficial. Teniendo en cuenta la demostración exitosa de NC de HAp recubiertos de quitosano para la administración de curcumina por Hemmati et al. (2021), la investigación de

un sistema híbrido que comprende el ensamblaje COS-HAp-gC₃N₄ resulta ser una vía interesante para futuras investigaciones en el desarrollo de NCs multifuncionales.

En cuanto al producto bioactivo seleccionado para la encapsulación, se eligió el extracto de *Rubia tinctorum* debido a su demostrada eficacia inhibitoria contra fitopatógenos fúngicos y bacterianos tanto en forma libre (Langa Lomba et al., 2021) como encapsulado en NCs de lignina-quitosano (Sánchez Hernández et al., 2022a). Este extracto contiene antraquinonas y compuestos fenólicos como componentes bioactivos principales, los cuales han demostrado actividad antifúngica significativa mediante mecanismos que incluyen la alteración de la integridad de la membrana celular fúngica y la inhibición de procesos enzimáticos esenciales (Langa Lomba et al., 2021).

El otro producto bioactivo seleccionado para encapsular fue el extracto de corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC., posee una potente actividad fungicida para el control pre y postcosecha de fitopatógenos, comparable a la eficacia de los fungicidas convencionales (Sánchez Hernández et al., 2022b). Este extracto contiene alcaloides, glucósidos del ácido quinóico y polifenoles como componentes bioactivos principales, los cuales exhiben actividad antimicrobiana significativa a través de varios mecanismos que incluyen la inhibición de la síntesis de la pared celular fúngica y la interrupción de la función de membrana (Sánchez Hernández et al., 2022b).

En conjunto, la combinación de estos compuestos bioactivos con los NCs desarrollados en este estudio resulta en un enfoque integral de protección de cultivos que aborda múltiples aspectos del control de fitopatógenos mientras minimiza el impacto ambiental. Las propiedades de liberación controlada de estas formulaciones aseguran que las concentraciones efectivas de los compuestos bioactivos se mantengan en el sitio objetivo, incluso bajo condiciones ambientales adversas.

6.4. Impacto de los tratamientos

En relación con la influencia que tuvieron los NCs desarrollados, los extractos en forma libre, el quitosano comercial y el control sin tratar sobre las características del mosto resultante, el análisis comparativo de los parámetros físicoquímicos reveló que, si bien los contenidos de ácido málico (2,37-3,26 g/L) y los niveles de azúcares (12,30-13,80 °Bé) se encuentran dentro de los rangos normales para mostos vitivinícolas, los valores de pH y acidez total presentan

desviaciones significativas respecto a los intervalos óptimos. Todos los tratamientos mostraron valores de pH elevados (4,02-4,22), superando el rango recomendado para mostos (3,20-3,80), lo que podría comprometer la estabilidad microbiológica y potenciar el desarrollo de microorganismos no deseados durante la fermentación.

Resulta preocupante en el caso de los tratamientos de extracto de *R. tinctorum* y quitosano, ambos con un valor de pH de 4,22, puesto que podrían ser susceptibles a contaminaciones bacterianas y presentar dificultades para la correcta evolución del color en el caso de elaboraciones tintas. Paralelamente, la acidez total se sitúa en el límite inferior o por debajo del rango óptimo (4,0-9,0 g/L) en la mayoría de los tratamientos, siendo especialmente baja para el tratamiento COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* (3,23 g/L). El control sin tratar es el único que alcanza el umbral mínimo recomendado (4,14 g/L). sugiriendo que los tratamientos aplicados ejercen un efecto desfavorable sobre el equilibrio ácido del mosto, aspecto fundamental para garantizar tanto la estabilidad microbiológica como las características sensoriales del producto final.

Respecto al NFA, los tratamientos de quitosano comercial (342 mg/L) y COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* (328 mg/L) superan ligeramente el límite superior recomendado (300 mg/L), lo podría desencadenar fermentaciones excesivamente vigorosas con potencial impacto negativo en la retención de compuestos aromáticos.

Un análisis más integral permite identificar tratamientos con perfiles potencialmente problemáticos: el tratamiento con COS-gC₃N₄-*R. tinctorum* combina un pH elevado con la acidez total más baja, lo que podría generar vinos faltos de frescura, estructuralmente débiles y con mayor susceptibilidad a la oxidación. Los tratamientos de extracto de *R. tinctorum* y quitosano presentan los valores de pH más críticos, comprometiendo seriamente la estabilidad del producto final. El control sin tratar, aunque con los valores más bajos en la mayoría de los parámetros, mantiene un equilibrio aceptable que podría traducirse en vinos menos estructurados, pero sin defectos manifiestos, sugiriendo que la ausencia de tratamiento preserva mejor las características intrínsecas del mosto. Por otra parte, el tratamiento con COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* también muestra un perfil relativamente equilibrado con valores intermedios en la mayoría de los parámetros evaluados, posicionándose como una alternativa

tecnológicamente viable que podría ofrecer un compromiso aceptable entre funcionalidad del tratamiento y calidad del mosto resultante.

Estas observaciones sugieren la necesidad de implementar estrategias pre-fermentativas, particularmente procesos de acidificación controlada, para reducir el pH en todos los tratamientos y aumentar la acidez total, particularmente en el caso de COS-g-C₃N₄-R. *tinctorum*. Estas correcciones resultarían fundamentales para garantizar la calidad y estabilidad de los vinos finales.

6.5. Aplicabilidad, limitaciones del estudio y líneas futuras de investigación

Aplicabilidad y oportunidades comerciales. El posible uso práctico de los NCs hacia aplicaciones comerciales presenta tanto desafíos como oportunidades prometedoras en el contexto agrícola actual. Aunque la comprensión total de los efectos a largo plazo y las implicaciones económicas de la nanotecnología agrícola requiere profundizar más en el tema, la expansión acelerada del sector sugiere una aceptación creciente de estas tecnologías innovadoras. Los NCs de quitosano desarrollados en este estudio poseen características que facilitan su adopción dentro de estrategias fitosanitarias integradas, donde su versatilidad podría extenderse más allá del control de *B. cinerea* hacia otras interacciones planta-fitopatógeno de relevancia agrícola. Esta escalabilidad tecnológica se alinea estratégicamente con las políticas europeas de transición hacia sistemas alimentarios más sostenibles, particularmente en el marco del Pacto Verde Europeo y la iniciativa "De la Granja a la Mesa", que priorizan la reducción progresiva de la dependencia de fungicidas sintéticos.

Marco regulatorio europeo. Los resultados obtenidos con los NCs basados en quitosano adquieren especial relevancia en el contexto regulatorio europeo actual. En la Unión Europea, algunas de las sustancias activas permitidas en la producción ecológica (a saber, extractos botánicos tradicionales y de origen biológico, soportes/auxiliares lumínicos y potenciadores de las defensas de las plantas) han sido aprobadas como "sustancias básicas" en virtud del Reglamento de productos fitosanitarios de la UE (artículo 23 del (CE) n.º 1107/2009). Estas sustancias básicas se enumeran en la Parte C del Anexo del Reglamento 540/2011.

De particular importancia para este estudio es que, según SANCO/12388/2013, el quitosano puede utilizarse en solución acuosa para su aplicación en diversos cultivos,

incluyendo bayas y frutos pequeños. Esta aprobación regulatoria proporciona una base sólida para la implementación práctica de los sistemas desarrollados, ya que el componente principal de los NCs evaluados cuenta con el respaldo legal necesario para su uso en viticultura europea.

Eficacia y potencial de integración. Los resultados presentados en esta investigación corroboran que los NCs formulados con polímeros de origen natural o sintético y materiales inorgánicos pueden incrementar significativamente la estabilidad y el rendimiento de diversos ingredientes activos, lo que concuerda con las observaciones de Pinto et al. (2022). Los resultados de campo obtenidos, aunque deben considerarse preliminares dado que corresponden a ensayos realizados en una única localidad y durante una única campaña, confirman que los extractos vegetales nanoencapsulados superan sustancialmente tanto a sus equivalentes no encapsulados como al quitosano comercial bajo condiciones de campo. La mayor eficacia observada puede atribuirse a varios factores: (a) efecto protector de los NCs sobre los compuestos bioactivos, (b) liberación sostenida del ingrediente activo, y (c) mejor adhesión a la superficie de las uvas durante las condiciones del viñedo.

Todo ello hace que estos sistemas de nanotransporte representen una herramienta prometedora para su integración en programas de Gestión Integrada de Plagas (GIP), al ofrecer una alternativa de bajo impacto ambiental que puede complementar otras estrategias de control sostenible, reduciendo la dependencia de fungicidas sintéticos convencionales mientras mantienen la eficacia necesaria para el manejo fitosanitario en viticultura.

Limitaciones del estudio. No obstante, a pesar de su eficacia prometedora, las consideraciones económicas y de escalabilidad constituyen aspectos críticos que requieren más estudios para determinar si estos NCs pueden constituirse como soluciones comercialmente viables capaces de abordar los desafíos agrícolas actuales y emergentes. En este contexto, las limitaciones técnicas propias a la producción de NCs para aplicaciones agrícolas deben equilibrarse con las restricciones económicas y los márgenes de rentabilidad para los productores (Vega Vásquez et al., 2020). Paralelamente, deben abordarse las problemáticas relacionadas con la evaluación toxicológica, el establecimiento de estándares de calidad, los marcos regulatorios de registro y la percepción social de estas tecnologías, tal como destacan An et al. (2022).

Líneas futuras de investigación. Los resultados prometedores de este estudio abren múltiples líneas de investigación, entre ellas la optimización de estrategias de aplicación bajo condiciones ambientales diferentes, el análisis de los efectos a largo plazo sobre la fisiología de

la vid y la calidad del vino final, y la ampliación de la producción para su aplicación comercial. Del mismo modo, se hace necesario evaluar la relación costo-eficacia y las vías reglamentarias necesarias para el registro de estos sistemas como productos fitosanitarios oficiales, a fin de facilitar su adopción en el mercado por los viticultores.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Este estudio demuestra que los nanotransportadores biopoliméricos basados en oligómeros de quitosano (combinados con materiales inorgánicos (g-C₃N₄ y HAp), que constituyen una alternativa tecnológica sostenible y eficaz para el control de *B. cinerea* en viticultura, validada mediante ensayos integrados desde laboratorio hasta campo.
2. Los nanotransportadores exhibieron actividad antifúngica significativa con diferencias en su eficacia: COS-HAp-g-C₃N₄-*U. tomentosa* mostró mejor actividad inhibitoria (CMI = 250 µg/mL) que COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum* (CMI = 375 µg/mL), demostrando que la incorporación de hidroxiapatito mejora las propiedades antifúngicas del sistema.
3. Los ensayos ex situ en condiciones muy favorables para el crecimiento fúngico demostraron que ambos nanotransportadores proporcionan protección eficaz contra *B. cinerea* en uvas “Tempranillo” y “Verdejo” a concentraciones de CMI×3, con control efectivo durante las fases críticas iniciales de infección (hasta 7-12 días), aunque se requerirían múltiples aplicaciones para protección prolongada.
4. Los ensayos de campo confirmaron la superioridad de las formulaciones nanoencapsuladas, alcanzando eficacias de control del 77,5 % (COS-HAp-C₃N₄-*U. tomentosa*) y 68,8 % (COS-g-C₃N₄-*R. tinctorum*), notablemente mejores que las de los extractos no encapsulados (50,0-56,3 %) y el quitosano comercial (53,8 %), lo que evidencia el valor añadido de la nanoencapsulación.
5. Las formulaciones desarrolladas demuestran compatibilidad con las prácticas vitivinícolas actuales, sin efectos fitotóxicos observables y con impacto mínimo sobre los parámetros fisicoquímicos fundamentales del mosto, confirmando su viabilidad para integración en protocolos de producción comercial.
6. Los nanotransportadores desarrollados representan una herramienta tecnológica viable para la transición hacia sistemas de protección de cultivos más sostenibles, reduciendo la dependencia de fungicidas sintéticos mientras mantienen niveles de eficacia apropiados para la gestión de la podredumbre gris en viticultura.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jawdah, Y., Wardan, R., Sobh, H., y Salameh, A. (2004). Antifungal activities of extracts from selected Lebanese wild plants against plant pathogenic fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(3), 377-386.
- Altieri, V., Rossi, V., y Fedele, G. (2023a). Biocontrol of *Botrytis cinerea* as influenced by grapevine growth stages and environmental conditions. *Plants*, 12(19), 3430. <https://doi.org/10.3390/plants12193430>.
- Altieri, V., Rossi, V., y Fedele, G. (2023b). Efficacy of preharvest application of biocontrol agents against gray mold in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1154370. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1154370>.
- Altieri, V., Rossi, V., y Fedele, G. (2024). Integration of mathematical modeling and target-based application of biocontrol agents for the control of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Pest Management Science*, 80(9), 4352-4360. <https://doi.org/10.1002/ps.8140>.
- Alves Santos, F. M. (2024). Enfermedades vid-bacterias, virus, fitoplasmas y fisiopatías [Apuntes de clase]. En *Protección de cultivos*. Universidad de Valladolid. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia.
- An, C., Sun, C., Li, N., Huang, B., Jiang, J., Shen, Y., Wang, C., Zhao, X., Cui, B., Wang, C., Li, X., Zhan, S., Gao, F., Zeng, Z., Cui, H., y Wang, Y. (2022). Nanomaterials and nanotechnology for the delivery of agrochemicals: strategies towards sustainable agriculture. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01214-7>.
- Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., y EUCAST-AFST. (2012). 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). *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(7), E246-247. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x>.

- Barrios, G. (2009). Síntomas, daños y métodos de lucha de la podredumbre gris en el cultivo de la vid. *Vida Rural*, 66-68. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Vrural%2FVrural_2009_290_66_68.pdf.
- Barrios, G., Coscollá, R., Lucas Espadas, A., Perez de Obanos, J. J., Pérez, J. L., y Toledo, J. (2004). *Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada* (5ª edición). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Bence, R., Barolo, S. M., Wunderlin, D. A., Martín, S. E., y Cano, N. C. H. (2024). Novel pesticides design: co-encapsulation of citral and cyproconazole for the control of *Botrytis cinerea* using biocompatible nano-carriers. *Pest Management Science*, 80(12), 6096-6106. <https://doi.org/10.1002/ps.8337>.
- Beresford, R. M., y Hill, G. N. (2008). *Botrytis* control without fungicide residues-is it just a load of rot. *New Zealand Winegrower*, 12(2), 104-106. https://www.researchgate.net/publication/266022568_Botrytis_control_without_fungicide_residues_is_it_just_a_load_of_rot.
- Bouquet, A., Torregrosa, L., Iocco, P., y Thomas, M. R. (2006). Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Methods in Molecular Biology*, 344, 273-285. <https://doi.org/10.1385/1-59745-131-2:273>.
- Buzón Durán, L., Sánchez Hernández, E., Sánchez Báscones, M., García González, M. C., Hernández Navarro, S., Correa Guimarães, A., y Martín Ramos, P. (2023). A coating based on bioactive compounds from *Streptomyces* spp. and chitosan oligomers to control *Botrytis cinerea* preserves the quality and improves the shelf life of table grapes. *Plants*, 12(3), 577. <https://doi.org/10.3390/plants12030577>.
- Calvo Garrido, C., Viñas, I., Elmer, P., Usall, J., y Teixidó, N. (2013). *Candida sake* CPA-1 and other biologically based products as potential control strategies to reduce sour rot of grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 57(4), 356-361. <https://doi.org/10.1111/lam.12121>.
- Calvo Garrido, C., Teixidó, N., Roudet, J., Viñas, I., Usall, J., y Fermaud, M. (2014). Biological control of *Botrytis* bunch rot in Atlantic climate vineyards with *Candida sake* CPA-1

- and its survival under limiting conditions of temperature and humidity. *Biological control: theory and applications in pest management*, 79, 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.011>.
- Calvo Garrido, C., Usall, J., Torres, R., y Teixidó, N. (2017). Effective control of *Botrytis* bunch rot in commercial vineyards by large-scale application of *Candida sake* CPA-1. *BioControl*, 62(2), 161-173. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9789-9>.
- Calvo Garrido, C., Haidar, R., Roudet, J., Gautier, T., y Fermaud, M. (2018). Pre-selection in laboratory tests of survival and competition before field screening of antagonistic bacterial strains against *Botrytis* bunch rot of grapes. *Biological Control: Theory and Applications in Pest Management*, 124, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.006>.
- Calvo Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S., y Fermaud, M. (2019). Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Frontiers in Plant Science*, 10, 105. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00105>.
- Canales, D., Montoille, L., Rivas, L. M., Ortiz, J. A., Yañez-S, M., Rabagliati, F. M., Ulloa, M. T., Alvarez, E., y Zapata, P. A. (2019). Fungicides Films of Low-Density Polyethylene (LDPE)/Inclusion Complexes (Carvacrol and Cinnamaldehyde) Against *Botrytis Cinerea*. *Coatings*, 9(12), 795. <https://doi.org/10.3390/coatings9120795>.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., y Teixidó, N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control: Theory and Applications in Pest Management*, 56(2), 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.007>.
- Carbó, A., Torres, R., Usall, J., Marín, A., Chiralt, A., y Teixidó, N. (2019). Novel film-forming formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1: biocontrol efficacy and performance at field conditions in organic wine grapes: Use of *C. sake* film-forming formulations. *Pest Management Science*, 75(4), 959-968. <https://doi.org/10.1002/ps.5200>.

- Casanova Gascón, J., Ferrer Martín, C., Bernad Eustaquio, A., Elbaile Mur, A., Ayuso Rodríguez, J. M., Torres Sánchez, S., Jarne Casasús, A., y Martín Ramos, P. (2019). Behavior of vine varieties resistant to fungal diseases in the Somontano region. *Agronomy*, 9(11), 738. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110738>.
- Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., y Pastrana, L. M. (2018). Nanotechnology in food packaging: Opportunities and challenges. En *Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues* (pp. 1-11). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00001-2>.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., y Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39-44. [https://doi.org/10.1016/s0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s0261-2194(02)00095-9).
- Dante, R. C., Martín Ramos, P., Sánchez Arévalo, F. M., Huerta, L., Bizarro, M., Navas Gracia, L. M., y Martín Gil, J. (2013). Synthesis of crumpled nanosheets of polymeric carbon nitride from melamine cyanurate. *Journal of Solid State Chemistry*, 201, 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2013.02.016>.
- De Angelis, G., Simonetti, G., Chronopoulou, L., Orekhova, A., Badiali, C., Petrucci, V., Portoghesi, F., D'Angeli, S., Brasili, E., Pasqua, G., y Palocci, C. (2022). A novel approach to control *Botrytis cinerea* fungal infections: uptake and biological activity of antifungals encapsulated in nanoparticle based vectors. *Scientific reports*, 12(1), 7989. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11533-w>.
- Dėnė, L., LauŹikė, K., Rasiukevičiūtė, N., Chrapačienė, S., Brazaitytė, A., Viršilė, A., Vaštakaitė-Kairienė, V., Miliauskienė, J., Sutulienė, R., Samuolienė, G., y Valiuškaitė, A. (2023). Defense response of strawberry plants against *Botrytis cinerea* influenced by coriander extract and essential oil. *Frontiers in plant science*, 13, 1098048. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1098048>.
- Díez Méndez, A., García Izquierdo, I., y Poveda, J. (2024). Microbial biological control of *Botrytis* bunch rot (*Botrytis cinerea*) of grapevine (*Vitis vinifera*) crops: a meta-analysis. *Crop Protection*, 190, 107085. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.107085>.

- Erarslan, A., Karakas, C. Y., Bozkurt, F., y Sagdic, O. (2023). Enhanced antifungal activity of electrospayed poly (vinyl alcohol)/chitosan nanospheres loaded with sage essential oil on the viability of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*. *ChemistrySelect*, 8(21). <https://doi.org/10.1002/slct.202300296>.
- FEAE (Federación Española de Enología). (2024). El consumo interno de vino crece durante la campaña 2023/24. Federación Española de Enología. <https://federacionenologia.com/eno0084/>.
- Fedele, G., González Domínguez, E., Si Ammour, M., Languasco, L., y Rossi, V. (2020). Reduction of *Botrytis cinerea* colonization of and sporulation on bunch trash. *Plant disease*, 104(3), 808-816. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1593-RE>.
- Fincheira, P., Espinoza, J., Levío-Raimán, M., Vera, J., Tortella, G., Brito, A. M. M., Seabra, A. B., Diez, M. C., Quiroz, A., y Rubilar, O. (2024). Formulation of essential oils-loaded solid lipid nanoparticles-based chitosan/PVA hydrogels to control the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *International journal of biological macromolecules*, 270(Pt 1), 132218. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132218>.
- Fischer, J., Beckers, S. J., Yiamsawas, D., Thines, E., Landfester, K., y Wurm, F. R. (2019). Targeted drug delivery in plants: enzyme-responsive lignin nanocarriers for the curative treatment of the worldwide Grapevine Trunk Disease Esca. *Advanced Science*, 6(15), 1802315. <https://doi.org/10.1002/advs.201802315>.
- Garde Cerdán, T., Souza da Costa, B., Rubio Bretón, P., y Pérez Álvarez, E. P. (2021). Nanotechnology: recent advances in viticulture and enology. *Journal of the science of food and agriculture*, 101(15), 6156-6166. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11406>.
- Gasser, F., Cardinale, M., Schildberger, B., y Berg, G. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* by successful introduction of *Pantoea ananatis* in the grapevine phyllosphere. *International Journal of Wine Research*, 53-63. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S31339>.
- Gil, G.F. y Pszczółkowski, P. (2007). Viticultura, fundamentos para optimizar la producción y calidad. *Ciencia e Investigación Agraria*, 34(3), 243-243. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202007000300009>.

- Guleria, G., Thakur, S., Shandilya, M., Sharma, S., Thakur, S., y Kalia, S. (2023). Nanotechnology for sustainable agro-food systems: The need and role of nanoparticles in protecting plants and improving crop productivity. *Plant physiology and biochemistry*, 194, 533-549. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.004>.
- Gupta, B., y Gupta, A. K. (2022). Photocatalytic performance of 3D engineered chitosan hydrogels embedded with sulfur-doped C₃N₄/ZnO nanoparticles for Ciprofloxacin removal: Degradation and mechanistic pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 198, 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.120>.
- Hadidi, M., Motamedzadegan, A., Jelyani, A. Z., y Khashadeh, S. (2021). Nanoencapsulation of hyssop essential oil in chitosan-pea protein isolate nano-complex. *LWT*, 144, 111254. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111254>.
- Hemmati, K., Ahmadi Nasab, N., Hesaraki, S., y Nezafati, N. (2021). *In vitro* evaluation of curcumin-loaded chitosan-coated hydroxyapatite nanocarriers as a potential system for effective treatment of cancer. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 32(10), 1267-1287. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1910920>.
- Hesami, G., Darvishi, S., Zarei, M., y Hadidi, M. (2021). Fabrication of chitosan nanoparticles incorporated with *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* hulls' essential oil as a potential antifungal preservative against strawberry grey mould. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(9), 4215-4223. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15110>.
- Hill, G. N., Beresford, R. M., y Evans, K. J. (2010). Tools for accurate assessment of *botrytis* bunch rot (*Botrytis cinerea*) on wine grapes. *New Zealand Plant Protection*, 63, 174-181. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2010.63.6560>.
- Ismail, A. M., Mosa, M. A., y El-Ganainy, S. M. (2023). Chitosan-Decorated Copper Oxide Nanocomposite: Investigation of Its Antifungal Activity against Tomato Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea*. *Polymers*, 15(5), 1099. <https://doi.org/10.3390/polym15051099>.
- ITACYL. (s.f.). *Botrytis* o Podredumbre gris-*Plagas*. Recuperado el 13 de junio de 2025, de <https://plagas.itacyl.es/botritis-de-la-vid>.

- Kasfi, K., Taheri, P., Jafarpour, B., y Tarighi, S. (2018). Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*. *Spanish Journal Of Agricultural Research*, 16(1), e1002. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11378>.
- Kasmi, M., Diakite, A., Barrijal, S., y Essalmani, H. (2024). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea* Pers. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 8(1). <http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v8i1.27>.
- Kim, W., y Saito, F. (2001). Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H₃PO₄ solution with Ca(OH)₂. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 85-88. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00034-1).
- Ky, I., Lorrain, B., Jourdes, M., Pasquier, G., Fermaud, M., Gény, L., Rey, P., Doneche, B., y Teissedre, P.-L. (2012). Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages: *Botrytis cinerea* effect on grape and wine quality. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(2), 215-226. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00191.x>.
- Langa Lomba, N., Sánchez Hernández, E., Buzón Durán, L., González García, V., Casanova Gascón, J., Martín Gil, J., y Martín Ramos, P. (2021). Activity of anthracenediones and flavoring phenols in hydromethanolic extracts of *Rubia tinctorum* against grapevine phytopathogenic fungi. *Plants*, 10(8), 1527. <https://doi.org/10.3390/plants10081527>.
- Liu, J., Wang, X., Chang, J., Du, P., Wu, J., Hou, R., Zhu, S., Liu, P., Miao, X., Zhang, P., y Zhang, Z. (2024). Green synthesized lignin nanoparticles for the sustainable delivery of pyraclostrobin to control strawberry diseases caused by *Botrytis cinerea*. *International journal of biological macromolecules*, 274(Pt2), 133488. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133488>.
- Lombardo, M. F., Panebianco, S., Restuccia, C., y Cirvilleri, G. (2023). Biocontrol efficacy of *Metschnikowia* spp. Yeasts in organic vineyards against major airborne diseases of table grapes in the field and in postharvest. *Foods*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/foods12183508>.

- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., y Jeong, K. C. (2017). Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydrate polymers*, 176, 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>.
- Machado, T. O., Grabow, J., Sayer, C., de Araújo, P. H. H., Ehrenhard, M. L., y Wurm, F. R. (2022). Biopolymer-based nanocarriers for sustained release of agrochemicals: A review on materials and social science perspectives for a sustainable future of agri- and horticulture. *Advances in colloid and interface science*, 303, 102645. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102645>.
- Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S., y Aziz, A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 43-57. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9111-2>.
- Maluin, F. N., y Hussein, M. Z. (2020). Chitosan-Based Agronanochemicals as a Sustainable Alternative in Crop Protection. *Molecules*, 25(7), 1611. <https://doi.org/10.3390/molecules25071611>.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2025). Listado de denominaciones de origen protegidas e indicaciones geográficas protegidas de vinos registrados en la unión europea. https://www.mapa.gob.es/es/dam/jcr:f9643333-ef75-4a2f-8864-afd1ade63fd1/02_vinos.pdf.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (s.f.). Registro de Productos Fitosanitarios. Recuperado el 13 de junio de 2025, de <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-productos/>.
- Minova, S., Sešķēna, R., Voitkāne, S., Metla, Z., Daugavietis, M., y Jankevica, L. (2015). Impact of pine (*Pinus sylvestris* L.) and spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) bark extracts on important strawberry pathogens. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B: Natural, Exact and Applied Sciences*, 69(1-2), 62-67. <https://doi.org/10.1515/prolas-2015-0008>.

- Mohammadi, A., Hashemi, M., y Hosseini, S. M. (2015). Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative food science & emerging technologies: IFSET: the official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology*, 28, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.011>.
- Mondéjar López, M., García Simarro, M. P., Navarro Simarro, P., Gómez Gómez, L., Ahrazem, O., y Niza, E. (2024). A review on the encapsulation of "eco-friendly" compounds in natural polymer-based nanoparticles as next generation nano-agrochemicals for sustainable agriculture and crop management. *International journal of biological macromolecules*, 280(Pt3), 136030. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136030>.
- Mundy, D. C., Elmer, P., Wood, P., y Agnew, R. (2022). A review of cultural practices for *Botrytis* bunch rot management in New Zealand vineyards. *Plants*, 11(21), 3004. <https://doi.org/10.3390/plants11213004>.
- OEMV (Observatorio Español del Mercado del Vino). (2024). Exportaciones españolas de vino - Julio 2024. <https://www.oemv.es/exportaciones-espanolas-de-vino-julio-2024>.
- OEMV (Observatorio Español del Mercado del Vino). (2025). Superficie de viñedo para uva de vinificación en España 2024. <https://www.oemv.es/superficie-de-vinedo-para-uva-de-vinificacion-en-espana-2024>.
- OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino). (2025). Base de datos. <https://www.oiv.int/es/que-hacemos/informe-de-descubrimiento-de-datos?oiv>.
- OIVE (Organización Interprofesional del Vino de España). (2024). El vino como motor económico de España. <https://interprofesionaldelvino.es/muchomasquevino/>.
- Oliveira Filho, J. G. de, da Cruz Silva, G., de Aguiar, A. C., Cipriano, L., de Azeredo, H. M. C., Bogusz Junior, S., y Ferreira, M. D. (2021). Chemical composition and antifungal activity of essential oils and their combinations against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 15(2), 1815-1825. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00765-x>.

- Onaran, A., y Bayan, Y. (2016). Antifungal activity of *Liquidambar orientalis* L., and *Myrtus communis* L. against some plant pathogenic fungi. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 59, 360-364.
- Pinto, T. V., Silva, C. A., Siquenique, S., y Learmonth, D. A. (2022). Micro- and nanocarriers for encapsulation of biological plant protection agents: A systematic literature review. *Agricultural Science & Technology*, 2(5), 838-857. <https://doi.org/10.1021/acsagcitech.2c00113>.
- Raj, V., Raorane, C. J., Lee, J. H., y Lee, J. (2021). Appraisal of chitosan-gum arabic-coated bipolymeric nanocarriers for efficient dye removal and eradication of the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *ACS applied materials & interfaces*, 13(40), 47354-47370. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c12617>.
- Rajabzadeh-Khosroshahi, M., Pourmadadi, M., Yazdian, F., Rashedi, H., Navaei-Nigjeh, M., y Rasekh, B. (2022). Chitosan/agarose/graphitic carbon nitride nanocomposite as an efficient pH-sensitive drug delivery system for anticancer curcumin releasing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 7, 103443. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103443>.
- Ren, L., Zhao, J., Li, W., Li, Q., Zhang, D., Fang, W., Yan, D., Li, Y., Wang, Q., Jin, X., y Cao, A. (2022). Site-specific controlled-release imidazolate framework-8 for dazomet smart delivery to improve the effective utilization rate and reduce biotoxicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 70(20), 5993-6005. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00353>.
- Righini, H., Baraldi, E., García Fernández, Y., Martel Quintana, A., y Roberti, R. (2019). Different Antifungal Activity of *Anabaena* sp., *Ecklonia* sp., and *Jania* sp. Against *Botrytis cinerea*. *Marine drugs*, 17(5), 299. <https://doi.org/10.3390/md17050299>.
- Salamone, A., Zizzo, G. V., y Scarito, G. (2006). The antimicrobial activity of water extracts from labiatae. *Acta horticulturae*, 723, 465-470. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.723.67>.

- Salgado, M., Rodríguez Rojo, S., Alves Santos, F. M., y Cocero, M. J. (2015). Encapsulation of resveratrol on lecithin and β -glucans to enhance its action against *Botrytis cinerea*. *Journal of food engineering*, 165, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.002>.
- Sánchez Hernández, E., Langa Lomba, N., González García, V., Casanova Gascón, J., Martín Gil, J., Santiago Aliste, A., Torres Sánchez, S., y Martín Ramos, P. (2022a). Lignin–chitosan nanocarriers for the delivery of bioactive natural products against wood-decay phytopathogens. *Agronomy*, 12(2), 461. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020461>.
- Sánchez Hernández, E., Martín Ramos, P., Martín Gil, J., Santiago Aliste, A., Hernández Navarro, S., Oliveira, R., y González García, V. (2022b). Bark extract of *Uncaria tomentosa* L. for the control of strawberry phytopathogens. *Horticulturae*, 8(8), 672. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080672>.
- Sánchez Hernández, E., González García, V., Correa Guimarães, A., Casanova Gascón, J., Martín Gil, J., y Martín Ramos, P. (2023). Phytochemical profile and activity against *Fusarium* Species of *Tamarix gallica* bark aqueous ammonia extract. *Agronomy*, 13(2), 496. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020496>.
- Santiago Aliste, A., Sánchez Hernández, E., Langa Lomba, N., González García, V., Casanova Gascón, J., Martín Gil, J., y Martín Ramos, P. (2022). Multifunctional nanocarriers based on chitosan oligomers and graphitic carbon nitride assembly. *Materials*, 15(24), 8981. <https://doi.org/10.3390/ma15248981>.
- Santiago Aliste, A., Sánchez Hernández, E., Buzón Durán, L., Marcos Robles, J. L., Martín Gil, J., y Martín Ramos, P. (2023). *Uncaria tomentosa*-loaded chitosan oligomers–hydroxyapatite–carbon nitride nanocarriers for postharvest fruit protection. *Agronomy*, 13(9), 2189. <https://doi.org/10.3390/agronomy13092189>.
- Santos Moriano, P., Fernandez Arrojo, L., Mengibar, M., Belmonte Reche, E., Peñalver, P., Acosta, F.N., Ballesteros, A.O., Morales, J.C., Kidibule, P., Fernández Lobato, M., Plou, F. J. (2017). Enzymatic production of fully deacetylated chitoooligosaccharides and their neuroprotective and anti-inflammatory properties. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(1), 57-67. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1295231>.

- Seglie, L., Spadaro, D., Trotta, F., Devecchi, M., Gullino, M. L., y Scariot, V. (2012). Use of 1-methylcyclopropene in cyclodextrin-based nanosponges to control grey mould caused by *Botrytis cinerea* on *Dianthus caryophyllus* cut flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 64(1), 55-57. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.014>.
- Šernaitė, L., Rasiukevičiūtė, N., Dambrauskienė, E., Viškelis, P., y Valiuškaitė, A. (2020a). Biocontrol of strawberry pathogen *Botrytis cinerea* using plant extracts and essential oils. *Zemdirbyste*, 107(2), 147-152. <https://doi.org/10.13080/z-a.2020.107.019>.
- Šernaitė, L., Rasiukevičiūtė, N., y Valiuškaitė, A. (2020b). Application of Plant Extracts to Control Postharvest Gray Mold and Susceptibility of Apple Fruits to *B. cinerea* from Different Plant Hosts. *Foods*, 9(10), 1430. <https://doi.org/10.3390/foods9101430>.
- Şesan, T. E., Enache, E., Iacomì, B. M., Oprea, M., Oancea, F., y Iacomì, C. (2015). Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 14(1), 29-43.
- Souri, P., Emamifar, A., y Davati, N. (2024). Time-kill kinetic of nano-ZnO-loaded nanoliposomes against *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*. *Brazilian journal of microbiology*, 55(2), 1669–1678. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01273-6>.
- Stan, D., Enciu, A. M., Mateescu, A. L., Ion, A. C., Brezeanu, A. C., Stan, D., Tanase, C. (2021). Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation. *Frontiers in pharmacology*, 12, 723233. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.723233>.
- Tang, G., Tian, Y., Niu, J., Tang, J., Yang, J., Gao, Y., Chen, X., Li, X., Wang, H., y Cao, Y. (2021). Development of carrier-free self-assembled nanoparticles based on fenhexamid and polyhexamethylene biguanide for sustainable plant disease management. *Green Chemistry*, 23(6), 2531-2540. <https://doi.org/10.1039/d1gc00006c>.
- Tardif, M., Amri, A., Deshayes, A., Greven, M., Keresztes, B., Fontaine, G., Sicaud, L., Paulhac, L., Bentejac, S., y Da Costa, J. P. (2023). An expertized grapevine disease image database including five grape varieties focused on Flavescence dorée and its

- confounding diseases, biotic and abiotic stresses. *Data in Brief*, 48, 109230. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109230>.
- Thakur, N., y Yadav, A. N. (2025). Nanotechnology in agriculture: A review on precision farming and sustainable crop production. *BioNanoScience*, 15(2). <https://doi.org/10.1007/s12668-025-01861-2>.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagiante, S., y Aziz, A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, 64(1), 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.009>.
- Tryfon, P., Kamou, N. N., Pavlou, A., Mourdikoudis, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., y Dendrinou-Samara, C. (2023). Nanocapsules of ZnO nanorods and geraniol as a novel mean for the effective control of *Botrytis cinerea* in tomato and cucumber plants. *Plants*, 12(5), 1074. <https://doi.org/10.3390/plants12051074>.
- Vega Vásquez, P., Mosier, N. S., y Irudayaraj, J. (2020). Nanoscale drug delivery systems: from medicine to agriculture. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 79. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00079>.
- Vega Vásquez, P., Mosier, N. S., y Irudayaraj, J. (2021). Nanovaccine for plants from organic waste: D-limonene-loaded chitosan nanocarriers protect plants against *Botrytis cinerea*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(29), 9903-9914. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c02818>.
- Wang, C. Y., Lou, X. Y., Cai, Z., Zhang, M. Z., Jia, C., Qin, J. C., y Yang, Y. W. (2021). Supramolecular Nanoplatfrom Based on Mesoporous Silica Nanocarriers and Pillararene Nanogates for Fungus Control. *ACS applied materials & interfaces*, 13(27), 32295-32306. <https://doi.org/10.1021/acsmi.1c08582>.
- Wang, C. Y., Jia, C., Zhang, M. Z., Yang, S., Qin, J. C., y Yang, Y. W. (2022). A lesion microenvironment-responsive fungicide nanoplatfrom for crop disease prevention and control. *Advanced healthcare materials*, 11(10), e2102617. <https://doi.org/10.1002/adhm.202102617>.

- Xue, Y., Zhou, S., Fan, C., Du, Q., y Jin, P. (2019). Enhanced antifungal activities of eugenol-entrapped casein nanoparticles against anthracnose in postharvest fruits. *Nanomaterials*, 9(12), 1777. <https://doi.org/10.3390/nano9121777>.
- Zhang, X., Tang, X., Zhao, C., Yuan, Z., Zhang, D., Zhao, H., Yang, N., Guo, K., He, Y., He, Y., Hu, J., He, L., He, L., y Qian, K. (2022). A pH-responsive MOF for site-specific delivery of fungicide to control citrus disease of *Botrytis cinerea*. *Chemical Engineering Journal*, 431(133351), 133351. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133351>.
- Zhou, Q., Xia, Z., Zhang, Y., Sun, Z., Zeng, W., Zhang, N., Yuan, C., Gong, C., Zhou, Y., y Xue, W. (2024). Design of a delivery vehicle chitosan-based self-assembling: controlled release, high hydrophobicity, and safe treatment of plant fungal diseases. *Journal of nanobiotechnology*, 22(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02386-8>.