



Sociedad
Española
de **Ciencias
Hortícolas**

94

**Marzo
2024**

ACTA DE HORTICULTURA

Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de
Ciencias Hortícolas

**JORNADAS DE LOS GRUPOS
DE TRABAJO DE
HORTICULTURA,
ALIMENTACIÓN Y SALUD,
FERTILIZACIÓN Y
SISTRATOS, FRESÓN Y
OTROS FRUTOS ROJOS**

Editores

Josefa López Marín

Víctor M. Gallegos Cedillo

Almudena Giménez Martínez

Roberto A. Rodríguez

Nuevos nanotransportadores para la encapsulación de carvacrol y su aplicación a la protección postcosecha de tomate

E. Sánchez-Hernández¹, J. Martín-Gil¹, A. Santiago-Aliste¹, A. Correa-Guimaraes¹,
V. González² y P. Martín-Ramos¹

¹ Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, Avda. de Madrid 44, 34004 Palencia (España), eva.sanchez.hernandez@uva.es

² Departamento de Sistemas Agrícolas, Forestales y Medio Ambiente, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza (España)

Resumen

Dada la preocupación por los riesgos para la salud y el medio ambiente asociados a los fungicidas sintéticos, es imprescindible explorar alternativas seguras, eficaces y sostenibles. La nanotecnología emerge como una opción prometedora en agricultura, tanto en pre- como en postcosecha. En esta línea, el uso de nanotransportadores o *nanocarriers* facilita la vehiculización de productos bioactivos de un modo eficaz, sin impactos medioambientales negativos. En esta comunicación se presenta un nuevo nanotransportador basado en oligómeros de quitosano, carboximetilcelulosa y alginato para la encapsulación de carvacrol. Se ha evaluado su aplicabilidad como recubrimiento para la protección postcosecha de frutos de tomate contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, y *Penicillium expansum* a escala de laboratorio, tanto *in vitro* como *ex situ*. En ensayos *in vitro*, los nanotransportadores cargados con carvacrol han demostrado ser altamente eficaces, con concentraciones mínimas inhibitorias de 23,3–31,3 µg/mL, inferiores a las de fungicidas convencionales no encapsulados como azoxistrobin, mancozeb, o fosetil-Al. En cuanto a la prolongación de la vida útil de los frutos durante el almacenamiento postcosecha, se requirieron dosis más elevadas de tratamiento (50–100 µg/mL, dependiendo del patógeno) para lograr una protección efectiva. Estos hallazgos sugieren que el uso de estos nanotransportadores cargados con productos bioactivos de origen natural representa una alternativa viable a los fungicidas convencionales para combatir los fitopatógenos del tomate.

Palabras clave: carvacrol, fungicidas naturales, nanotecnología, protección postcosecha, tomate.

Novel nanocarriers for carvacrol encapsulation and their application to tomato postharvest protection

Abstract

Given concerns about the health and environmental risks associated with synthetic fungicides, exploring safe, effective, and sustainable alternatives is imperative. Nanotechnology is emerging as a promising option in agriculture, both pre- and post-harvest. In this line, using nanocarriers facilitates the transport of bioactive products efficiently, without negative environmental impacts. This communication presents a new nanocarrier based on chitosan oligomers, carboxymethylcellulose, and alginate for carvacrol encapsulation. Its applicability as a coating for postharvest protection of tomato fruits has been evaluated against *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, and *Penicillium expansum* at a laboratory scale, both *in vitro* and *ex-situ*. In *in vitro* assays, the carvacrol-loaded nanocarriers were highly effective, with minimum inhibitory concentrations in the 23.3–31.3 µg/mL range, lower than those of conventional non-encapsulated fungicides such as azoxystrobin, mancozeb, or fosetyl-Al. In terms of prolonging fruit shelf life during postharvest storage, higher treatment doses (50–100 µg/mL, depending on the pathogen) were required to achieve effective protection. These findings suggest that the use of these nanocarriers loaded with bioactive products of natural origin represents a viable alternative to the use of these nanocarriers.

Keywords: carvacrol, natural fungicides, nanotechnology, postharvest protection, tomato, natural fungicides.

INTRODUCCIÓN

La naturaleza perecedera de las frutas y hortalizas después de la cosecha, influenciada por diversos factores como el ambiente, las condiciones de almacenamiento y el transporte, conlleva importantes desafíos para mantener su calidad y durabilidad. Los avances en la investigación de polímeros y nanotecnología ofrecen oportunidades prometedoras para abordar las crecientes necesidades en seguridad alimentaria, mejorando su vida útil, sus propiedades de protección y su composición nutricional. En este contexto, los sistemas de administración basados en biopolímeros emergen como una estrategia prometedora para encapsular compuestos bioactivos y mejorar su absorción, estabilidad y funcionalidad. Esta comunicación aborda la síntesis y caracterización de un nuevo nanotransportador desarrollado mediante el entrecruzamiento de oligómeros de quitosano (COS), carboximetilcelulosa (CMC) y alginato (ALG), y su aplicación para el transporte del carvacrol como compuesto bioactivo (CBA). Su eficacia se ha evaluado *in vitro* frente a *B. cinerea* (moho gris), *C. coccodes* (antracnosis) y *P. expansum* (moho azul), seguido de un análisis de su efecto protector durante el almacenamiento de tomates inoculados artificialmente con los fitopatógenos previamente mencionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y aislados fúngicos

Botrytis cinerea (CECT 20973) y *P. expansum* (CECT 20906) se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia), mientras que *C. coccodes* (CRD 246/190) fue facilitado por el Centro Regional de Diagnóstico de Aldearrubia (Junta de Castilla y León). Los frutos de tomate (cv. «Daniela») empleados en los ensayos de protección postcosecha fueron cultivados por «Huerta El Gurullo» (Cuevas del Almanzora, Almería) conforme a la normativa de agricultura ecológica de la UE.

Síntesis de los nanotransportadores y encapsulación del carvacrol

La síntesis de COS se realizó según el procedimiento propuesto por Sánchez-Hernández et al. (2022). Todos los componentes del nanotransportador, COS–CMC–ALG, se metacrilaron empleando una solución de anhídrido metacrílico en tetrahidrofurano, siguiendo el protocolo establecido por Gupta y Gupta (2022). El CBA, carvacrol, se adicionó sobre la mezcla anterior y se sonicó para su encapsulación. El producto resultante obedeció a la relación molar COS–CMC–ALG de 2:2:1, con un 20% en peso de CBA. La eficiencia de encapsulación del CBA fue superior al 85%, y la eficacia de la liberación fue superior al 90%, siguiendo el protocolo establecido por Sánchez-Hernández et al. (2022).

Caracterización del nuevo nanotransportador

Los espectros infrarrojos de los nanotransportadores se recogieron utilizando un espectrómetro FTIR Nicolet iS50 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). La caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó utilizando un microscopio JEOL (Akishima, Tokio, Japón) JEM 1011 HR. Las condiciones operativas fueron: 100 kV; 25.000–120.000× aumentos. Las micrografías se obtuvieron con una cámara CCD GATAN ES1000W (4000×2672 píxeles).

Ensayos de actividad antifúngica *in vitro*

Los nanotransportadores COS–CMC–ALG vacíos (sin carvacrol) y cargados con carvacrol, así como la comparación realizada con fungicidas sintéticos (azoxistrobin, mancozeb y fosetil-Al) se ensayaron frente a *B. cinerea*, *C. coccodes*, y *P. expansum* mediante el método de dilución en agar, según los procedimientos estandarizados del EUCAST.

Ensayos de protección postcosecha en frutos de tomate

En condiciones controladas de laboratorio, se evaluó la eficacia de los nanotransportadores de COS–CMC–ALG cargados con carvacrol para la protección postcosecha de frutos de tomate, inoculados artificialmente con *B. cinerea*, *C. coccodes*, y *P. expansum*, siguiendo el protocolo propuesto por Sánchez-Hernández et al. (2023), con la aplicación del tratamiento a diferentes concentraciones (50 y 100 µg/mL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El entrecruzamiento de los distintos componentes del nanotransportador fue confirmado mediante espectroscopía infrarroja. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los nanotransportadores (Figura 1) mostraron nanopartículas esféricas homogéneas con un tamaño promedio de 114 nm. Los componentes del nanotransportador presentaron actividad antifúngica *per se*, inhibiendo a los fitopatógenos con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en el rango de 93,75–125 µg/mL, pero dicha actividad fue mejorada al encapsular carvacrol, logrando la completa inhibición del crecimiento micelial a concentraciones de entre 23,3 y 31,3 µg/mL, dependiendo del patógeno. En cuanto a los resultados de protección postcosecha, presentados en la Tabla 1, a una concentración de 50 µg/mL, el tratamiento resultó eficaz para lograr una protección completa en frutos inoculados con *P. expansum*, requiriendo una dosis mayor frente a *B. cinerea* (100 µg/mL). En el caso de *C. coccodes*, se logró un nivel de protección superior al 90% a 100 µg/mL, en comparación con el control positivo, lo que sugiere que sería necesaria una dosis ligeramente superior para lograr una protección completa. Las concentraciones referidas son inferiores a las de fungicidas convencionales: el azoxistrobin se mostró ineficaz frente a los 3 fitopatógenos a la dosis recomendada (62500 µg/mL); el fosetil-Al inhibió *B. cinerea* y *C. coccodes* a la dosis recomendada (2000 µg/mL), mientras que sólo alcanzó el 65% de inhibición en *P. expansum*; y, en cuanto al mancozeb, a pesar de inhibir con éxito el crecimiento micelial en los patógenos estudiados (150 µg/mL), es preciso tener en cuenta ha sido prohibido por la normativa europea sobre productos fitosanitarios.

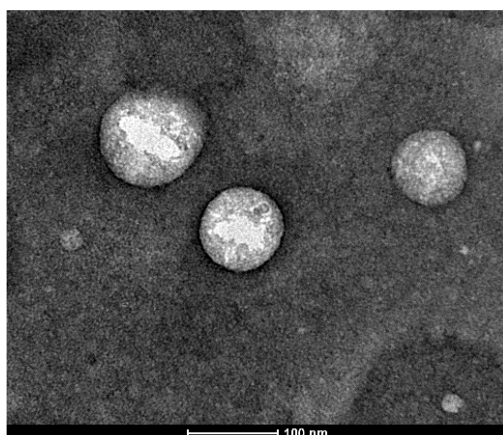


Figura 1. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de los nanotransportadores COS–CMC–ALG cargados con carvacrol.

Tabla 1. Diámetro de la lesión (DL) y reducción del tamaño de la lesión (RTL) del tratamiento con nanotransportadores COS–CMC–ALG cargados con CBA (carvacrol) a 50 y 100 µg/mL en frutos de tomate. El control negativo se refiere a frutos no tratados sin patógeno, y el control positivo indica frutos inoculados con patógeno sin tratamiento.

Patógeno	Tratamiento	DL (mm)	RTL (%)
-	Control negativo	0	100
<i>B. cinerea</i>	Control positivo	25,4 ± 2,8	0
	50 µg/mL	17,3 ± 2,3	31,9
	100 µg/mL	0	100
<i>C. coccodes</i>	Control positivo	24,2 ± 3,7	0
	50 µg/mL	21,5 ± 1,6	78,8
	100 µg/mL	1,8 ± 1,1	92,6
<i>P. expansum</i>	Control positivo	16,7 ± 1,2	0
	50 µg/mL	0	100
	100 µg/mL	0	100

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que los nanotransportadores cargados con carvacrol representan una alternativa viable a los fungicidas convencionales para combatir fitopatógenos postcosecha en hortalizas.

Bibliografía

- Gupta, B., 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. *Int. J. Biol. Macromol.* 198:87–100.
- Sánchez-Hernández, E., Langa-Lomba, N., González-García, V., Casanova-Gascón, J., Martín-Gil, J., Santiago-Aliste, A., Torres-Sánchez, S. and Martín-Ramos, P. 2022. Lignin–chitosan nanocarriers for the delivery of bioactive natural products against wood-decay phytopathogens. *Agronomy*. 12:461–477.
- Sánchez-Hernández, E., Álvarez-Martínez, J., González-García, V., Casanova-Gascón, J., Martín-Gil, J., Martín-Ramos, P. 2023. *Helichrysum stoechas* (L.) Moench inflorescence extract for tomato disease management. *Molecules*. 28:5861–5878.