



## Encapsulación de extractos de *Uncaria tomentosa* en nanotransportadores para el control de *Botrytis cinerea* en fresa

E. Sánchez-Hernández<sup>1</sup>, A. Santiago-Aliste<sup>1</sup>, V. González-García<sup>2</sup>, A. Correa-Guimaraes<sup>1</sup>, J. Martín-Gil<sup>1</sup>, y P. Martín-Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, 34004 Palencia; eva.sanchez.hernandez@uva.es (E.S.-H.); alberto.santiago@estudiantes.uva.es (A.S.-S.); adriana.correa@uva.es (A.C.-G.); mgil@iaf.uva.es (J.M.-G.); pmr@uva.es (P.M.-R.)

<sup>2</sup> Departamento de Sistemas Agrícolas, Forestales y Medioambientales, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza; vgonzalezg@aragon.es (V.G.-G.)

**Abstract:** Given the risks to health and the environment associated with synthetic fungicides, it is necessary to explore safe, effective, and sustainable alternatives. One viable approach is the utilization of bioactive natural products (BNPs). However, BNPs face problems of lability, solubility, and lack of specificity. These issues can be overcome through the implementation of nanoencapsulation. This study focuses on the development of novel nanocarriers designed to encapsulate bioactive compounds, specifically a *Uncaria tomentosa* extract. Their applicability as a coating for postharvest protection of strawberry fruits against *Botrytis cinerea* Pers. was investigated at a laboratory scale, both *in vitro* and *ex-situ*. In *in vitro* inhibition tests, the nanocarrier loaded with the *U. tomentosa* extract demonstrated remarkable efficacy, exhibiting a minimum inhibitory concentration of 22.5 µg·mL<sup>-1</sup>, better than that of the unencapsulated extract, and resulted in a significant reduction in the quantity of active substance required. As for the impact on prolonging shelf life and controlling rot during postharvest fruit storage, the treatment showed excellent protection of artificially inoculated strawberry fruits at a concentration of 45 µg·mL<sup>-1</sup>. The findings suggest that nanocarriers containing extracts from cat's claw bark hold promise as biorational agents and, notably, as an alternative to conventional fungicides for managing strawberry phytopathogens.

**Palabras clave:** *Fragaria × ananassa*; moho gris; nanotecnología; protección postcosecha; uña de gato





## 1. Introducción

El cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier) es uno de los más demandados en todo el mundo. Desde el año 1990, la producción mundial de fresa casi se ha cuadruplicado, pasando de 2,5 millones de toneladas a 9,2 millones en 2021. Los principales productores son: Estados Unidos, Turquía, España, Egipto y Colombia; siendo España el líder en la exportación de fruta fresca y generando anualmente un valor superior a los 400 millones de euros. No obstante, la vida postcosecha de la fresa es corta debido a su elevada tasa de respiración, su sensibilidad a la temperatura, su textura blanda, y el alto grado de deterioro causado por diversos patógenos como *B. cinerea* [1].

El ascomiceto *B. cinerea* no sólo es el patógeno postcosecha más importante para la fresa [2], sino que también está considerado como el segundo fitopatógeno en términos de importancia a nivel mundial, puesto que infecta a más de 230 hospedadores pertenecientes a más de 170 familias de plantas de importancia agrícola y agroalimentaria [3]. Hasta la fecha, el enfoque más eficaz para controlarlo es la aplicación de fungicidas sintéticos convencionales. Sin embargo, se han impuesto estrictas normativas que limitan el uso de dichos productos químicos en vista de su facilidad de diseminación y de la aparición de resistencia de los hongos a los mismos, así como una mayor vigilancia de sus efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente [4].

Como alternativas se han propuesto estrategias de biocontrol del patógeno mayoritariamente centradas en el uso de antagonistas microbianos (tanto procariotas como eucariotas) o de extractos de plantas y sus aceites esenciales. Respecto a estos últimos, que incluyen las sustancias básicas contempladas en el Art. 23 del Reglamento (CE) nº 1107/2009, presentan problemas de estabilidad, solubilidad y falta de especificidad, que limitan su efectividad. Un enfoque para solventar estas limitaciones y maximizar la eficacia de estos productos es la micro/nanoencapsulación, ya que los nanotransportadores o *nanocarriers* facilitan la vehiculización de productos bioactivos de un modo eficaz [5].

En cuanto al uso de nanotransportadores contra *B. cinerea*, ensayos *in vitro* han demostrado que las nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) son capaces de penetrar las paredes celulares de los conidios y las hifas somáticas de *B. cinerea*, y pueden utilizarse para el suministro de pterostilbeno, un compuesto natural, y fluopiram, un antifúngico sintético [6]. También se han observado cambios morfológicos significativos en el micelio fúngico tras el tratamiento con aceites esenciales de menta encapsulados en sílice mesoporoso SBA-15 [7]. La encapsulación de aceites esenciales de *Nepeta* spp. en microcápsulas de quitosano ha demostrado ser efectiva *in vitro* [8], y perlas de quitosano y alginato incorporadas con aceites esenciales de clavo y lavanda y vainillina han demostrado ser útiles para la protección postcosecha de uvas de mesa [9]. Además, los nanotransportadores de quitosano cargados con D-limoneno también se han utilizado para desencadenar una respuesta de defensa sistémica a demanda en las plantas, mejorando la resistencia a la enfermedad contra *B. cinerea* [10].

La presente comunicación aborda la síntesis y caracterización de un nuevo nanotransportador basado en el entrecruzamiento (*cross-linking*) de oligómeros de quitosano (COS), g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e hidroxiapatito (HAp) y su ensayo para la vehiculización de un extracto hidroamoniaco de uña de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC.). La eficacia de los nanotransportadores g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-COS-HAp-Ut contra *B. cinerea* se ha estudiado primero *in vitro*, y a continuación se ha explorado su efecto protector durante la fase de almacenamiento en fresas inoculadas artificialmente con *B. cinerea*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Reactivos, material vegetal y aislado fúngico

El quitosano de alto peso molecular, la enzima Neutrase™ 0,8 L y el agar de dextrosa de patata (PDA) empleados fueron suministrados por Hangzhou Simit Chem. and Tech. Co. (Hangzhou,





China), Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca), y Becton Dickinson (Bergen County, NJ, EE.UU.), respectivamente.

El extracto hidroamoniaco de *U. tomentosa* seleccionado como biorracional a encapsular fue preparado a partir de una muestra compuesta de corteza de 25 especímenes de uña de gato de La Merced, Chanchamayo, Perú, según el procedimiento descrito en Sánchez-Hernández *et al.* [11].

Las fresas de la variedad "Fortuna" utilizadas en los estudios de protección postcosecha fueron suministradas por la Sociedad Cooperativa Andaluza Santa María de La Rábida (Palos de la Frontera, Huelva, España), y habían sido cultivadas según las normas de la agricultura ecológica, sin utilizar pesticidas sintéticos. Los frutos se recolectaron y se enviaron inmediatamente en transporte refrigerado para que los experimentos pudieran iniciarse en las 24 horas siguientes a la recolección. Los frutos se seleccionaron teniendo en cuenta aspectos como la uniformidad del tamaño, la ausencia de daños físicos e infecciones fúngicas, y >75% de la superficie de color rojo, de acuerdo con los criterios sugeridos por Romanazzi *et al.* [12].

El aislado fúngico de *B. cinerea* (CECT 20973) fue adquirido en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España).

## 2.2. Preparación del extracto

Para disolver los polifenoles y otros compuestos bioactivos de interés contenidos en la corteza de *U. tomentosa*, se optó por la digestión en una solución acuosa de amoníaco, un medio de extracción empleado en trabajos previos de nuestro grupo con buenos resultados [13-15]. La muestra de polvo de corteza se digirió primero en una solución acuosa de amoníaco durante 2 h, después se sometió a sonicación en modo pulsado durante 10 min utilizando un ultrasonificador UIP1000hdT (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania), y después se dejó reposar durante 24 h. A continuación, se ajustó a pH neutro utilizando ácido acético. Por último, la solución se centrifugó a 9000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman n.º 1.

## 2.3. Síntesis de los nanotransportadores y encapsulación del extracto

La síntesis de oligómeros de quitosano (COS) se realizó según el procedimiento propuesto por Sánchez-Hernández *et al.* [16]. Todos los componentes del nanotransportador se metacrilaron empleando una solución de anhídrido metacrílico (AM) en tetrahidrofurano (THF). La solución de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> metacrilada se añadió gota a gota a la solución de COS metacrilada, se adicionó a ésta la solución de HAp metacrilada, y se sometió a ultrasonificación para obtener una proporción en peso de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>:COS:HAp de 0,5:1:1 (el exceso de AM se eliminó mediante agitación y lavados sucesivos). La encapsulación de *U. tomentosa* (Ut) se realizó mediante la adición de 105 mg del extracto hidroamoniaco sobre la mezcla y sonicación. El producto resultante obedeció a la relación molar g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>:COS:HAp:Ut de 0,5:1:1:0,25. La eficiencia de encapsulación del extracto fue superior al 95% (determinada por HPLC).

## 2.4. Caracterización del nanotransportador

El espectro vibracional de los nanotransportadores se registró utilizando un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) Nicolet iS50 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.) equipado con un sistema de reflectancia total atenuada (ATR), en el intervalo 400–4000 cm<sup>-1</sup>, con una resolución espectral de 1 cm<sup>-1</sup>. La caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se llevó a cabo 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). Para la tinción negativa de las muestras se utilizó acetato de uranilo (2%).





### 2.5. Ensayos de actividad antifúngica *in vitro*

La actividad antifúngica de los nanotransportadores g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-COS-HAp vacíos (sin extracto de *U. tomentosa*) y cargados con el extracto de *U. tomentosa* se ensayó frente a *B. cinerea* utilizando el método de dilución en agar, según los procedimientos estandarizados del EUCAST. Se añadieron alícuotas de los nanotransportadores a un medio de PDA para obtener concentraciones finales en el rango de 5,62 a 22,5 µg·mL<sup>-1</sup>. Se transfirieron tapones de micelio de *B. cinerea* a placas con los diferentes tratamientos (3 placas por concentración, con 2 réplicas). Como control se utilizó el medio de PDA sin ninguna modificación. La inhibición del crecimiento se estimó tras la incubación en la oscuridad a 25 °C durante una semana, mediante la fórmula  $((d_c - d_t)/d_c) \times 100$ , donde  $d_c$  es el diámetro medio de la colonia en el control y  $d_t$  es el diámetro medio de la colonia tratada. Las concentraciones efectivas (CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub>) se estimaron mediante el análisis PROBIT en SPSS Statistics v.25 (IBM; Armonk, NY, EE.UU.).

### 2.6. Ensayos de protección postcosecha en frutos de fresa

En condiciones controladas de laboratorio, se evaluó la eficacia de los nanotransportadores de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-COS-HAp cargados con el extracto de *U. tomentosa* para la protección postcosecha de frutos de fresa de la variedad "Fortuna" inoculados artificialmente con el fitopatógeno. El protocolo se modificó ligeramente a partir del propuesto por Buzón-Durán *et al.* [17]. Las fresas se desinfectaron durante 2 min con una solución de NaOCl al 3%, después se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en una campana de flujo laminar sobre papel absorbente estéril. Las fresas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos homogéneos de 60 frutos (es decir, tres repeticiones con 15 frutos por repetición y tratamiento), asegurándose de que todos los frutos estuvieran en el intervalo de 20-30 g/fruto y que fueran mayores de 25 mm de diámetro. Se trataron dos grupos con la formulación para la que se registró mayor actividad *in vitro* contra *B. cinerea*, es decir, con los nanotransportadores de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-COS-HAp-Ut, a diferentes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI y CMI×2, es decir, 22,5 y 45 µg·mL<sup>-1</sup>), mientras que los otros grupos sirvieron como control negativo (sin tratamiento y sin patógeno) y positivo (con patógeno y sin tratamiento). Se hicieron heridas superficiales (Ø = 5 mm) en la zona ecuatorial de cada fruto, y, a continuación, las fresas se sumergieron en los tratamientos durante 5 min minutos, para después secarse a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar. En las heridas superficiales se colocó un tapón de un cultivo de *B. cinerea*, con el micelio orientado hacia la herida del fruto. Los frutos se colocaron en cajas de plástico tapadas y se almacenaron durante 7 días a 4 °C y 95-98% HR, y después se expusieron a un periodo de conservación de 4 días a 20 °C y 95-98% HR. Durante el almacenamiento, se analizó el porcentaje de frutos infectados y la gravedad de la enfermedad (según una escala empírica con seis grados: 0, fruta sana; 1, 1-20% de superficie de fruta infectada; 2, 21-40% de superficie de fruta infectada; 3, 41-60% de superficie de fruta infectada; 4, 61-80% de superficie de fruta infectada; 5, más del 81% de superficie infectada con esporulación).

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Caracterización del nanotransportador

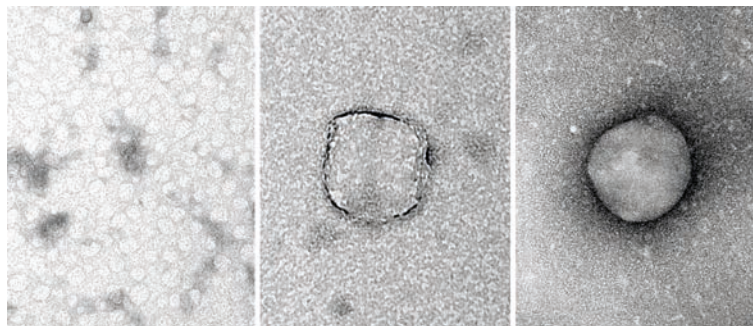
Los espectros infrarrojos del nanotransportador de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-COS-HAp confirmaron el entrecruzamiento (mediado por AM) de los diferentes componentes, destacando la presencia de bandas a 806 y 890 cm<sup>-1</sup> atribuibles al modo vibracional "breathing" de las unidades de tri-s-triazina y al modo de deformación de los enlaces N-H, respectivamente. Las bandas ubicadas entre 1100 y 1700 cm<sup>-1</sup> se asignan a los modos de tensión típicos de los heterociclos CN, mientras





las bandas ubicadas entre 2200 y 2500  $\text{cm}^{-1}$  se pueden asignar a la presencia de un triple o un doble enlace ( $\text{C}=\text{N}$  o  $\text{C}=\text{C}$ ). Adicionalmente, las bandas a 2800 y 3300  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de tensión N-H y/o C-H. Además de las bandas anteriores, atribuidas al  $\text{g-C}_3\text{N}_4$ , se observa una banda entre 900 y 1100  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  del hidroxiapatito, confirmando con ello su presencia en el material compuesto.

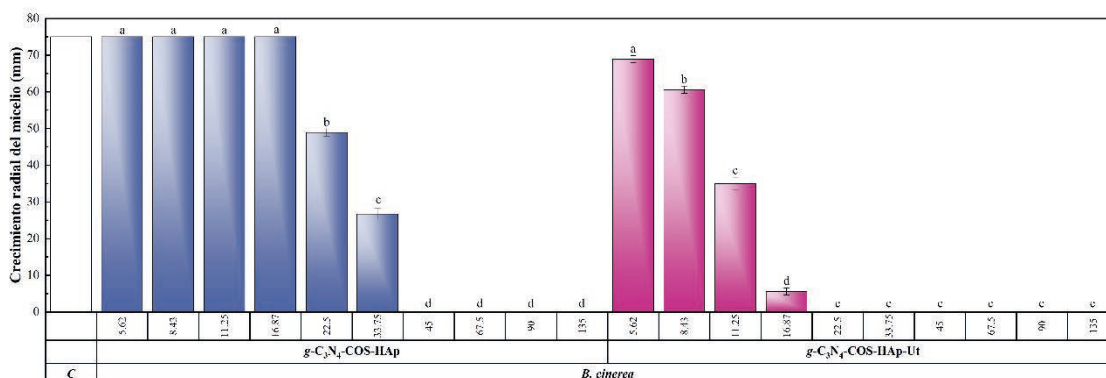
Las imágenes de microscopía TEM de los nanotransportadores (Figura 1) mostraron nanopartículas esféricas homogéneas con un tamaño promedio de 90 nm.



**Figura 1.** Micrografías TEM de los nanotransportadores  $\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAp}$  sin extracto encapsulado (izquierda y centro) y con extracto de *U. tomentosa* encapsulado (derecha). El tamaño medio de los nanotransportadores es de 90 nm.

### 3.2. Pruebas de inhibición del crecimiento *in vitro* y *ex situ*

Los resultados de las pruebas de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* se resumen en la Figura 2. Los componentes del nanotransportador presentaron actividad antifúngica *per se*, inhibiendo al fitopatógeno a una concentración de 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , pero dicha actividad fue mejorada al encapsular el extracto de *U. tomentosa*, logrando la completa inhibición del crecimiento micelial a una concentración de 22,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A efectos comparativos, las CMI para el extracto amoniacoal de *U. tomentosa* solo y en forma de complejos conjugados con COS, fueron de 375 y 93,75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Las CMI de los tratamientos basados en nanotransportadores también son inferiores a las de fungicidas convencionales como azoxystrobin, metalaxil, fosetil-Al o mancozeb (con CMI de 625.000, 21.000, 2000 y 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente) [11].



**Figura 2.** Inhibición del crecimiento radial del micelio de *B. cinerea* en los ensayos *in vitro* realizados con los nanotransportadores  $\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAp}$  vacíos (sin extracto de *U. tomentosa*) y cargados con el extracto de *U. tomentosa* (Ut). La barra blanca (C) representa los controles.

En cuanto a los resultados de protección postcosecha, se presentan en la Tabla 1 y la Figura 3. A una concentración de 22,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , el tratamiento evitó el desarrollo de la enfermedad hasta el

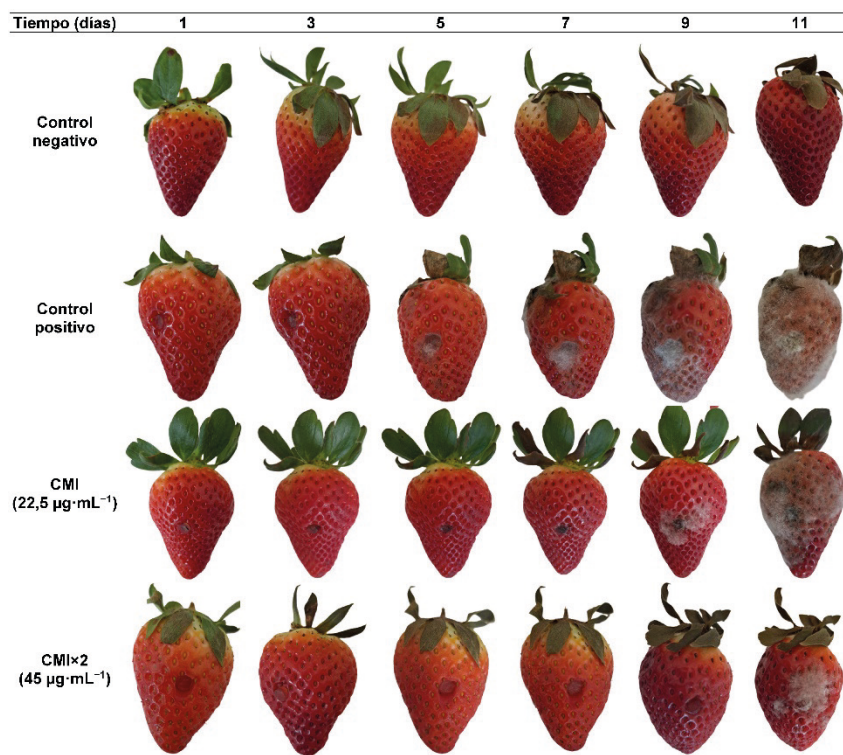




séptimo día, y logró una reducción notable hasta el noveno día, pero la severidad el undécimo día fue notable. A la mayor concentración ensayada ( $45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), el control de podredumbre gris mejoró, logrando mantener el nivel de daño bajo hasta el undécimo día. A efectos comparativos, la eficacia del tratamiento con  $g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAp-Ut}$  fue notablemente superior que las referidas para otros recubrimientos a base de quitosano empleados para la protección de frutos de fresa: la severidad de la enfermedad al final de los experimentos fue menor que la registrada para dosis de 1% *p/v* de acetato de quitosano, cloruro de quitosano, glutamato de quitosano y formiato de quitosano [12]. El efecto protector del tratamiento también superior a los referidos para aceite esencial de *Zataria multiflora* Boiss. encapsulado en nanopartículas de quitosano (ensayado a  $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) [18], complejos conjugados COS-*U. tomentosa* ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) [11], y complejos conjugados de COS con *Silene uniflora* Roth ( $3750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) [17].

**Tabla 1.** Evolución de la severidad de ataque la podredumbre gris en frutos de fresa sin inocular (control negativo) e inoculados artificialmente con *B. cinerea* (no tratados, control positivo, y tratados con dos concentraciones del nanomaterial cargado con *U. tomentosa*) durante su almacenamiento postcosecha.

| Tiempo (días) | Control negativo | Control positivo | CMI ( $22,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | CMI×2 ( $45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |
|---------------|------------------|------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1             | 0                | 0                | 0                                             | 0                                             |
| 3             | 0                | 0,3              | 0                                             | 0                                             |
| 5             | 0                | 0,8              | 0                                             | 0                                             |
| 7             | 0                | 1,3              | 0                                             | 0                                             |
| 9             | 0                | 3,1              | 1                                             | 0,3                                           |
| 11            | 0                | 4,5              | 3,7                                           | 1,6                                           |



**Figura 3.** Visualización de la evolución de la podredumbre gris en frutos de fresa sin inocular (control negativo) e inoculados artificialmente con *B. cinerea* (no tratados, control positivo, y tratados con dos concentraciones del nanomaterial cargado con extracto de *U. tomentosa*) durante su almacenamiento postcosecha.

#### 4. Conclusiones





La encapsulación de extracto de uña de gato en nanotransportadores  $g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAP}$  permitió la completa inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en ensayos *in vitro* a una concentración de  $22,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , notablemente inferior a la del extracto sin encapsular y a las referidas para antifúngicos de síntesis como azoxystrobin, metalaxil, fosetil-Al o mancozeb. La aplicación del tratamiento a una concentración de  $45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  sobre fresas variedad “Fortuna” inoculadas artificialmente logró mantener el nivel de daño causado por el moho gris a niveles bajos (1,6 sobre 5) hasta el undécimo día, mejorando la vida postcosecha de los frutos. Los resultados obtenidos para la protección de la fresa son susceptibles de aplicación a otros cultivos, como la vid, otras frutas y hortalizas.

## Referencias

1. Dhital, R.; Joshi, P.; Becerra-Mora, N.; Umagiliyage, A.; Chai, T.; Kohli, P.; Choudhary, R. Integrity of edible nano-coatings and its effects on quality of strawberries subjected to simulated in-transit vibrations. *LWT* **2017**, *80*, 257-264, doi:10.1016/j.lwt.2017.02.033.
2. Petrasch, S.; Knapp, S.J.; van Kan, J.A.L.; Blanco-Ulate, B. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* **2019**, *20*, 877-892, doi:10.1111/mpp.12794.
3. Dean, R.; Van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 414-430, doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
4. Wisniewski, M.; Droby, S.; Norelli, J.; Liu, J.; Schena, L. Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *122*, 3-10, doi:10.1016/j.postharvbio.2016.05.012.
5. Vega-Vásquez, P.; Mosier, N.S.; Irudayaraj, J. Nanoscale Drug Delivery Systems: From Medicine to Agriculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2020**, *8*, doi:10.3389/fbioe.2020.00079.
6. De Angelis, G.; Simonetti, G.; Chronopoulou, L.; Orekhova, A.; Badiali, C.; Petrucci, V.; Portoghesi, F.; D'Angeli, S.; Brasili, E.; Pasqua, G.; Palocci, C. A novel approach to control *Botrytis cinerea* fungal infections: uptake and biological activity of antifungals encapsulated in nanoparticle based vectors. *Scientific Reports* **2022**, *12*, 7989, doi:10.1038/s41598-022-11533-w.
7. Weisany, W.; Samadi, S.; Tahir, N.A.-r.; Amini, J.; Hossaini, S. Nano-encapsulated with mesoporous silica enhanced the antifungal activity of essential oil against *Botrytis cinerea* (Helotiales; Sclerotiniaceae) and *Colletotrichum nymphaeae* (Glomerellales; Glomerellaceae). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2022**, *122*, 101902, doi:10.1016/j.pmpp.2022.101902.
8. Amighi, M.; Zahedifar, M.; Alizadeh, H.; Payandeh, M. Encapsulation of *Nepeta hormozganica* and *Nepeta dschuprensis* essential oils in shrimp chitosan NPs: Enhanced antifungal activity. *Int J Biol Macromol* **2023**, *238*, 124112, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.124112.
9. Sangsuwan, J.; Sutthasupa, S. Effect of chitosan and alginate beads incorporated with lavender, clove essential oils, and vanillin against *Botrytis cinerea* and their application in fresh table grapes packaging system. *Packaging Technology and Science* **2019**, *32*, 595-605, doi:10.1002/pts.2476.





10. Vega-Vásquez, P.; Mosier, N.S.; Irudayaraj, J. Nanovaccine for Plants from Organic Waste: d-Limonene-Loaded Chitosan Nanocarriers Protect Plants against *Botrytis cinerea*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2021**, *9*, 9903-9914, doi:10.1021/acssuschemeng.1c02818.
11. Sánchez-Hernández, E.; Martín-Ramos, P.; Martín-Gil, J.; Santiago-Aliste, A.; Hernández-Navarro, S.; Oliveira, R.; González-García, V. Bark Extract of *Uncaria tomentosa* L. for the Control of Strawberry Phytopathogens. *Horticulturae* **2022**, *8*, 672-689, doi:10.3390/horticulturae8080672.
12. Romanazzi, G.; Feliziani, E.; Santini, M.; Landi, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* **2013**, *75*, 24-27, doi:10.1016/j.postharvbio.2012.07.007.
13. Sánchez-Hernández, E.; Balduque-Gil, J.; Barriuso-Vargas, J.J.; Casanova-Gascón, J.; González-García, V.; Cuchí-Oterino, J.A.; Lorenzo-Vidal, B.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Holm Oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) Bark Aqueous Ammonia Extract for the Control of Invasive Forest Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 11882, doi:10.3390/ijms231911882.
14. Sánchez-Hernández, E.; González-García, V.; Casanova-Gascón, J.; Barriuso-Vargas, J.J.; Balduque-Gil, J.; Lorenzo-Vidal, B.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Valorization of *Quercus suber* L. Bark as a Source of Phytochemicals with Antimicrobial Activity against Apple Tree Diseases. *Plants* **2022**, *11*, 3415-3433, doi:10.3390/plants11243415.
15. Sánchez-Hernández, E.; González-García, V.; Correa-Guimarães, A.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Phytochemical Profile and Activity against *Fusarium* Species of *Tamarix gallica* Bark Aqueous Ammonia Extract. *Agronomy* **2023**, *13*, 496-513, doi:10.3390/agronomy13020496.
16. Sánchez-Hernández, E.; Langa-Lomba, N.; González-García, V.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Santiago-Aliste, A.; Torres-Sánchez, S.; Martín-Ramos, P. Lignin-chitosan nanocarriers for the delivery of bioactive natural products against wood-decay phytopathogens. *Agronomy* **2022**, *12*, 461-477, doi:10.3390/agronomy12020461.
17. Buzón-Durán, L.; Sánchez-Hernández, E.; Martín-Ramos, P.; Navas-Gracia, L.M.; García-González, M.C.; Oliveira, R.; Martín-Gil, J. *Silene uniflora* Extracts for Strawberry Postharvest Protection. *Plants* **2023**, *12*, 1846-1860, doi:10.3390/plants12091846.
18. Mohammadi, A.; Hashemi, M.; Hosseini, S.M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innov Food Sci Emerg Technol* **2015**, *28*, 73-80, doi:10.1016/j.ifset.2014.12.011.

