

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



“Efecto de suplementos basados en liposomas cargados con urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) en la producción de cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus*”

TESIS

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

Ingeniero en Nanotecnología

Presenta

Cecilia Gabriela Sedano Pereyra

Director de tesis:

Dra. Haydee López Rodríguez

Codirector de tesis:

Dr. Guillermo Amaya Parra

Ensenada Baja California, febrero de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**EFFECTO DE SUPLEMENTOS BASADOS EN LIPOSOMAS CARGADOS CON UREA
(CO(NH₂)₂) EN LA PRODUCCIÓN DE CUERPO FRUCTÍFERO DEL HONGO
*PLEUROTUS OSTREATUS***

TESIS

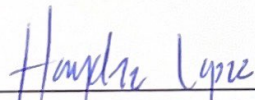
PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

CECILIA GABRIELA SEDANO PEREYRA

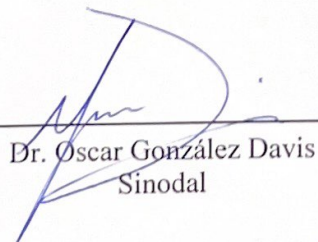
Aprobada por:



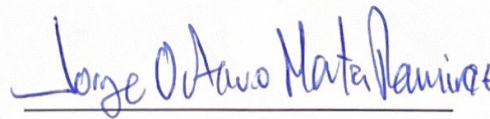
Dra. Haydeé López Rodríguez
Directora



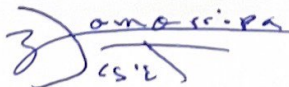
Dr. Guillermo Amaya Parra
Codirector



Dr. Oscar González Davis
Sinodal



Dr. Jorge Octavio Mata Ramírez
Sinodal



Dr. José De Jesús Zamarripa Topete
Sinodal

Resumen:

Las vastas cantidades de biorresiduos sólidos producidos en la sociedad crean enormes problemas medioambientales, económicos y sociales. En México se le ha asociado un costo económico de más de 25,000 millones de dólares, cerca del 2.5 de su Producto Interno Bruto (PIB). De ser reutilizados y aprovechados, estos biorresiduos podrían generar ingresos de más de 400,000 millones de pesos. Los hongos del género *Pleurotus* son el tercer hongo comestible más cultivado del mundo y son conocidos por crecer en una gran variedad de biorresiduos agroindustriales. Su cultivo es considerado un proceso biotecnológico con aplicaciones medioambientales de gran relevancia donde mediante bioconversión combina el aprovechamiento de biorresiduos con la producción de alimento alto en proteína, contribuyendo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU). La adición de nitrógeno a cultivos de *P. ostreatus* ha demostrado una mejora en su rendimiento, no obstante, las soluciones utilizadas tradicionalmente, como el nitrato de amonio, se disocian y volatilizan, disminuyendo el número de nutrientes disponibles para el cultivo. El presente trabajo usa liposomas cargados con urea como suplementos en el cultivo de *P. ostreatus*; los liposomas fueron sintetizados por el método de inyección de solventes, y fueron caracterizados por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopía UV-Vis con el fin de conocer su tamaño, dispersión y estabilidad coloidal, morfología y eficiencia de encapsulamiento. Se obtuvieron sistemas coloidales altamente estables (potencial Z < -33 mV) y de escala nanométrica (~150 nm). No obstante, no fue posible determinar su efecto en el crecimiento del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, liposomas, nanofertilizantes, bioconversión, hongos comestibles, nanotecnología.

Abstract

The vast amount of solid bio-waste produced in society creates enormous environmental, economic and social problems. In Mexico, it has been associated with an economic cost of more than 25 billion dollars, about 2.5 of its GDP. If reused and exploited, this bio-waste could generate revenues of more than 400 billion pesos. Mushrooms of the *Pleurotus* genus are the third most cultivated edible fungi in the world and are known to grow on a wide variety of agro-industrial biowaste. Their cultivation is considered a biotechnological process with highly relevant environmental applications where bioconversion combines the use of biowaste with the production of high-protein food, contributing to the United Nations Sustainable Development Goals. The addition of nitrogen to *P. ostreatus* cultures has shown an improvement in their yield, however, the most common solutions used, such as ammonium nitrate, dissociate and volatilize, decreasing the number of nutrients available to the crop. The present work uses urea-loaded liposomes as supplements in the culture of *P. ostreatus*; the liposomes were synthesized by the solvent injection method, and were characterized by means of AFM, DLS and UV-Vis spectroscopy to know their size, dispersion and colloidal stability, morphology and encapsulation efficiency. Highly stable (Z-potential < -33 mV) and nanometer scale (~150 nm) colloidal systems were obtained. However, it was not possible to determine their effect on *P. ostreatus* fruiting body growth.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, liposomes, nanofertilizers, bioconversion, edible mushrooms, nanotechnology.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Residuos lignocelulósicos	1
1.2 Cultivo de hongos comestibles: <i>P. ostreatus</i>	2
1.3 Suplementos en el cultivo de <i>P. ostreatus</i>	6
1.4 Nanotecnología.....	8
1.4.1 Aplicaciones en la agricultura.....	10
1.5 Sistemas de liberación controlada: nanoencapsulaciones	11
2. Justificación	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivos	15
4.1 General	15
4.2 Específicos	15
5.1 Síntesis de liposomas	16
5.2 Caracterización de liposomas	18
5.3 Cultivo de <i>P. ostreatus</i>	19
5.3.1 Preparación del sustrato	19
5.3.2 Formación de primordios	20
5.3.3 Crecimiento del cuerpo fructífero.....	20
5.4 Análisis estadístico	20
6. Resultados y discusión	21
6.1 Caracterización de liposomas	21
6.2 Cultivo de <i>P. ostreatus</i>	24
7. Conclusiones.....	33
8. Trabajo a futuro.....	34
9. Referencias.....	35

Índice de figuras

Figura 1. Cultivo de <i>P. ostreatus</i> .	3
Figura 2. Ciclo de vida del hongo ostra <i>Pleurotus ostreatus</i> .	5
Figura 3. Diagrama esquemático de los enfoques Top-Down y Bottom-Up.	9
Figura 4. Estructuras utilizadas como nanocargadores.	12
Figura 5. Unidades individuales y formación de un liposoma.	13
Figura 6. Representación esquemática de las etapas principales del método de inyección de solventes.	16
Figura 7. Diagrama esquemático del proceso de concentración de liposomas.	17
Figura 8. Representación esquemática del proceso de diálisis para el aislamiento de liposomas.	18
Figura 9. Consistencia de los liposomas cargados de urea tras ser sintetizados y después de dializar.	21
Figura 10. Imagen obtenida por microscopía óptica para L-0.00.	23
Figura 11. Imágenes tridimensionales obtenidos por AFM de liposomas L-0.00.	24
Figura 12. Colonización total del sustrato para los tratamientos L-3.00-1, L-1.50-1, L-0.75-1 y U-0.75-1.	25
Figura 13. Cuerpo fructífero de U-0.75-1 previo a su cosecha.	25
Figura 14. Crecimiento del cuerpo fructífero de <i>P. ostreatus</i> suplementado con urea libre a diferentes tratamientos.	26
Figura 15. Crecimiento del cuerpo fructífero de <i>P. ostreatus</i> suplementado con urea encapsulada en liposomas a diferentes tratamientos.	27
Figura 16. Gráfico de crecimiento total en peso (g) para el cuerpo fructífero de <i>P. ostreatus</i> en función del tipo de tratamiento utilizado.	29
Figura 17. Diagrama de caja y bigotes para los pesos obtenidos del cuerpo fructífero de <i>P. ostreatus</i> a diferentes tipos de encapsulado y concentraciones.	30
Figura 18. Análisis de optimización de respuesta.	32

Índice de tablas

Tabla 1. Tratamientos utilizados para el cultivo de <i>P. Ostreatus</i> .	19
Tabla 2. Tamaño promedio, índice de polidispersión (PDI) y potencial Z para los tratamientos encapsulados en liposomas.	22
Tabla 3. Crecimiento del cuerpo fructífero para los diferentes tratamientos suplementados.	28
Tabla 4. Estadística descriptiva para los tratamientos libres (no encapsulados).	30
Tabla 5. Estadística descriptiva para los tratamientos encapsulados en liposomas.	30
Tabla 6. Eficiencia biológica de <i>P. ostreatus</i> a diferentes tratamientos y concentraciones.	31

1. Introducción

En este capítulo se introducen los conceptos básicos y fundamentos que se deben tener en cuenta para el desarrollo del presente trabajo de investigación. Se incluye la importancia de los residuos lignocelulósicos, su aplicación en el cultivo de *P. ostreatus* y su ciclo de vida, la necesidad del uso de suplementos en su cultivo, y la implementación de la nanotecnología en la agricultura y el prometedor uso de sistemas de liberación controlada en el cultivo de *P. ostreatus*.

1.1 Residuos lignocelulósicos

En 2020, el Banco Mundial reportó que alrededor de 2,240 millones de toneladas de residuos sólidos se generan mundialmente, lo que supone una huella de 0.79 kilogramos por persona y día. Con el rápido crecimiento de la población y la urbanización, se espera que la generación anual de residuos aumente un 73% con respecto a los niveles de 2020, hasta alcanzar los 3,880 millones de toneladas en 2050 [1]. En México, durante 2018 se recolectaron en promedio, cada día, 107,055,547 kilogramos de residuos sólidos urbanos en el territorio nacional, de los cuales el 17% corresponden a papel y cartón [2, 3]. De ser reutilizados y aprovechados, estos desechos celulósicos podrían generar ingresos de más de 400,000 millones de pesos [4, 5].

La celulosa es considerada el compuesto orgánico más abundante derivado principalmente de la biomasa de plantas [6]; se trata de un biopolímero natural renovable que puede obtenerse y biosintetizarse a partir de plantas [7], madera, animales marinos, bacterias y hongos [8]. Otros materiales que contienen celulosa pueden incluir tentativamente residuos agrícolas, plantas acuáticas y pastos. Sin embargo, desde el punto de vista de la comercialización industrial, la celulosa se ha utilizado durante siglos como materia prima procedente de árboles y otras plantas en diversas aplicaciones [6]. La producción mundial de este biopolímero se ha estimado en 100,000 millones de toneladas cada año [9], de los cuales 60,000 millones de toneladas son procesadas por las industrias papelera, textil y química [6].

Como se sabe, el papel y sus residuos son fácilmente degradables en la naturaleza y reciclables; las fibras de celulosa pueden reciclarse hasta siete veces. Por lo tanto, es

necesario reciclar los residuos de papel útiles. Si se recicla el papel, se ahorran recursos, por ejemplo, árboles, agua, petróleo, electricidad y también la superficie del vertedero [10]. No obstante, aunque el papel y cartón sean biodegradables y puedan reciclarse, estos se mezclan con otros tipos de residuos sólidos y dificultan el proceso de reciclaje hasta hacerlo casi imposible [11]. A su vez, la eliminación de este tipo de biorresiduos también provoca un gran desperdicio de biopolímeros y azúcares enzimáticos que pueden utilizarse en diversos ámbitos, como la agricultura [12].

Para aprovechar los biopolímeros encontrados en el papel y cartón (celulosa, hemicelulosa y lignina), son necesarios complejos de enzimas capaces de despolimerizar dichos polímeros. Estos complejos incluyen las enzimas oxidativas lacasa y manganeso peroxidasa que participan en la degradación de la lignina y las enzimas hidrolíticas xilanasas y celulasas, que participan en la degradación de la hemicelulosa y la celulosa, respectivamente [13]. Se ha reportado que *Pleurotus ostreatus*, un hongo cultivado comercialmente, es capaz de secretar estas enzimas de manera extracelular y utilizar un amplio rango de biorresiduos agroindustriales como sustrato para su crecimiento [14]. En 2020 se reportó el uso de desechos de papel y cartón como un tipo de sustrato para el crecimiento de este tipo de hongos comestibles [15]. El objetivo del estudio era disminuir residuos de bajo uso o valor comercial a la vez que se utilizan los componentes orgánicos como nutrientes para el cultivo de hongos ostra (*P. ostreatus*). El cultivo de hongos se presentó como un proceso biotecnológico económicamente viable para la conversión de diversos residuos lignocelulósicos.

1.2 Cultivo de hongos comestibles: *P. ostreatus*

El consumo de hongos se ha incrementado a nivel mundial en los últimos años debido a sus propiedades nutricionales y a su exquisitez culinaria, lo que facilita su continuo desarrollo y su producción durante todo el año. Entre los hongos comestibles cultivados comercialmente, los hongos del género *Pleurotus* son un importante hongo comestible con un alto valor medicinal. *P. ostreatus* es conocido como hongo ostra debido a que su cuerpo fructífero se abre en forma de ostra durante su proceso de morfogénesis [16] (Figura 1). Son el tercer hongo más cultivado del mundo y en 2021, representan el 25% de los hongos comestibles del mundo [17]. Pueden cosecharse de forma natural a partir de madera en

descomposición o cultivarse artificialmente, ya que es muy adaptable y puede crecer en una gran variedad de biorresiduos agroindustriales [18]. Han sido ampliamente estudiados porque pueden colonizar y degradar una amplia gama de residuos lignocelulósicos, tienen un alto valor gastronómico, requieren menos tiempo para crecer que otros hongos comestibles, y su cuerpo fructífero es menos frecuentemente afectado por patógenos, además de tener otras aplicaciones en el área médica, antitumoral, antimicrobiana y antidiabética [16].



Figura 1. Cultivo de *P. ostreatus* [19].

P. ostreatus, y en general los hongos comestibles, cuentan con un gran valor nutricional ya que son bastante ricos en proteínas, con un importante contenido en aminoácidos esenciales y fibra, pobres en grasa, pero con un excelente contenido en ácidos grasos importantes. Además, aportan un contenido nutricional importante de vitaminas (B1, B2, B12, C, D y E) [20]. Por lo tanto, podrían ser una excelente fuente de muchos nutraceuticos diferentes, ser utilizados directamente en la dieta humana y para promover la salud por el efecto sinérgico de todos los compuestos bioactivos presentes.

Funcionan como descomponedores primarios, convirtiendo los tejidos orgánicos muertos en los nutrientes que necesitan para su crecimiento. El cuerpo fructífero de los hongos se desarrolla a partir de la germinación de la espora seguida de la formación del

micelio, donde estos secretan enzimas digestivas que digieren y descomponen la lignina-celulosa en partículas más pequeñas, antes de su absorción. A medida que obtienen nutrientes para su crecimiento a partir de materiales orgánicos muertos, también descomponen la materia orgánica muerta, convirtiéndola de nuevo en nutrientes para el suelo [12, 21]. Aunado a su alto valor nutricional, gastronómico y comercial, se considera a *P. ostreatus* como un buen candidato con el potencial de degradar, transformar y utilizar naturalmente los componentes orgánicos de los residuos como nutrientes para la formación de su cuerpo fructífero. Por ende, su cultivo es considerado un proceso biotecnológico con aplicaciones medioambientales de gran relevancia [22], donde mediante bioconversión es posible combinar el aprovechamiento de biorresiduos tanto con uso como sin uso y valor comercial, con la producción de alimento alto en proteína, contribuyendo así con los objetivos de desarrollo sostenible de la Organización de las Naciones Unidas.

En su ciclo de vida, los hongos ostra pasan por fases vegetativas y reproductivas (Figura 2). La fase vegetativa inicia con la germinación de una basidiospora en un sustrato adecuado, que da lugar a un micelio monocariótico que contiene núcleos genéticamente idénticos (n) y es capaz de un crecimiento independiente indefinido, donde el micelio crece por debajo y dentro del sustrato, liberando enzimas y absorbiendo nutrientes. Cuando dos micelios monocariotas compatibles están en contacto directo, son capaces de establecer un dicarion fértil por fusión plasmogamia o fusión de la hifa. Este dicarion ($n + n$), con conexiones en fíbula y binucleado en cada compartimento hifal, contiene dos núcleos genéticamente diferentes (uno de cada monocarion) en todo el micelio. Una vez alcanzadas las condiciones reportadas como óptimas para la fructificación, los hongos pasan por la fase reproductiva, donde el micelio dicarionte se diferenciará en cuerpos fructíferos con estructuras especializadas llamadas basidios. En estas células binucleadas con forma de garrote, que se forman en las láminas (himenio) de cada cuerpo fructífero, tiene lugar la cariogamia (fusión de los núcleos emparejados; $2n$) y la meiosis (recombinación y segregación). Los cuatro núcleos haploides resultantes se desplazan a los esterigmas del basidio, para formar cuatro nuevas basidiosporas. Una vez los cuerpos fructíferos están maduros, se descargan las basidiosporas, comenzando de nuevo el ciclo de vida sexual [21, 23, 24].

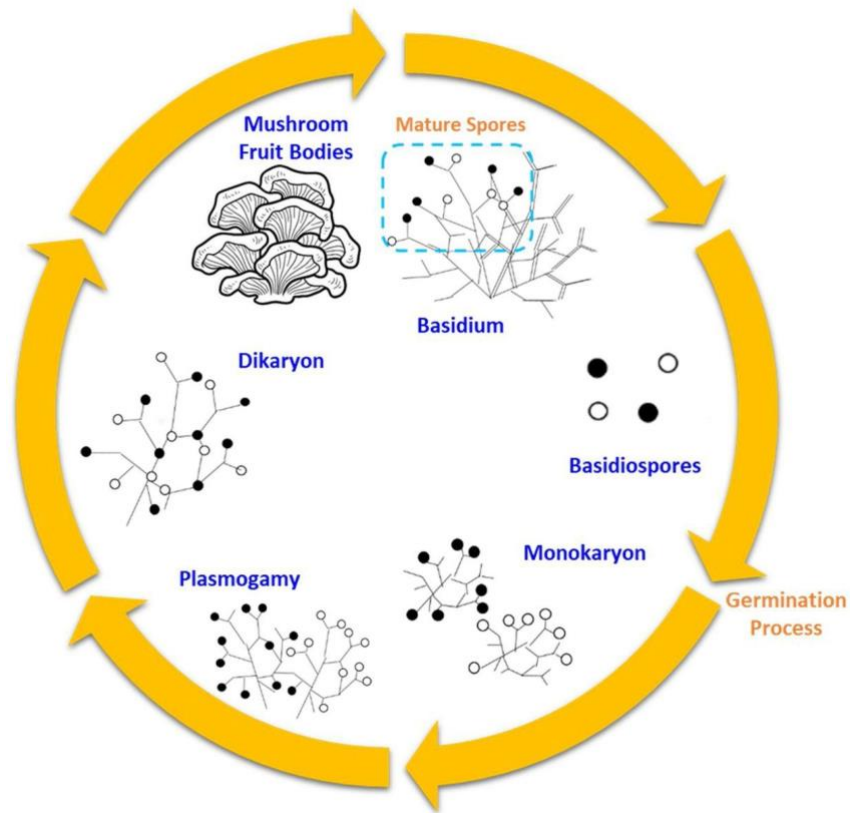


Figura 2. Ciclo de vida del hongo ostra *Pleurotus ostreatus* [24].

El cultivo de *P. ostreatus* ofrece uno de los métodos más factibles y económicos para la bioconversión de residuos lignocelulósicos [16]. Desarrollados por primera vez en Alemania durante la Primera Guerra Mundial [25], los métodos de cultivo de *P. ostreatus* han sido aplicados exitosamente a gran escala. Desde entonces, las continuas mejoras tecnológicas han dado lugar al desarrollo de varios métodos de cultivo, entre ellos los métodos de cultivo en recipientes y bolsas cilíndricas, así como en bandejas de madera, que son rentables y provechosos para los agricultores en el ámbito de la agroindustria [21]. El cultivo por recipientes cilíndricos es uno de los más utilizados para cultivar *P. ostreatus*,

donde las bolsas o recipientes contenedores del sustrato suelen ser fabricadas con polipropileno (PP), polietileno (PE) o policloruro de vinilo (PVC) [26]. Las bandejas de madera por otra parte suelen ser rectangulares o de cualquier otra forma conveniente, manteniendo espacios descubiertos destinados a aireación en caso de ser apiladas [21].

De igual manera, existe un amplio rango de biorresiduos que pueden utilizarse para el cultivo de *P. ostreatus*, pero dependen de la disponibilidad en su ubicación geográfica. La disponibilidad de un buen sustrato es un requisito importante para un mejor crecimiento y un mayor rendimiento del hongo. Los sustratos reportados con producción de cuerpo fructífero incluyen hojas de palma, bagazo de caña de azúcar, paja (arroz y mazorca de maíz [26], soja, arroz, trigo y cacahuate [16],) pasto [27], residuos textiles de algodón, subproductos de la producción de maíz, aserrín y cascarilla de café [22], entre otros. Un sustrato ideal debe contener una cantidad adecuada de nitrógeno y carbohidratos para un rápido crecimiento de los hongos; el carbono total (C), el nitrógeno total (N) y la relación carbono/nitrógeno (C/N) son factores importantes que determinan la colonización del micelio y el desarrollo de cuerpos fructíferos en los hongos ostra [28].

La composición de nutrientes es otro de los factores que limitan la colonización saprobiótica de los hongos cultivados, y en particular la fructificación de *Pleurotus spp* [29]. Los materiales comúnmente utilizados como sustrato base de *P. ostreatus* son fuentes pobres de nitrógeno: durante la producción de basidiomas, el agotamiento del nitrógeno en el sustrato es inadecuado y contribuye a la disminución del rendimiento, ya que en esta etapa la mayor parte del nitrógeno se utiliza para el crecimiento del micelio [30]. En este aspecto, la técnica de suplementación tiene un gran potencial, ya que el contenido nutricional del sustrato puede mejorarse suplementando nitrógeno para aumentar el rendimiento de los hongos ostra [29]. Esta técnica se entiende como un método de cultivo basado en la adición física de suplementos nutricionales al compost, durante el proceso de compostaje, la mezcla de materias primas, en el desove o durante el *casing* [31].

1.3 Suplementos en el cultivo de *P. ostreatus*

Los suplementos son productos comúnmente fabricados que contienen harina vegetal desgrasada, como la harina de soya, y otras fuentes de proteína orgánica. En el mercado hay

varios suplementos comerciales disponibles, la mayoría de ellos diseñados para complementar la fase II (en el spawning) y la fase III (en el casing) del sustrato producido para el cultivo de *P. ostreatus*. Entre ellos se encuentran productos como Calprozime®, Champfood® y Promycel 600® [32]. Además de estos suplementos existentes, el uso de subproductos agrícolas de bajo coste disponibles en las regiones productivas es un enfoque prometedor. Entre estos productos se destacan la urea y el nitrato de amonio, reconocidos como ingredientes activos para complementar los sustratos empleados en el cultivo de hongos en Latinoamérica y Europa [33]. Al ser más fáciles de aplicar, menos costosos y más respetuosos con el medio ambiente, los suplementos biológicos ricos en nitrógeno son más recomendables en cuanto a los sintéticos [29].

Se ha reportado que la liberación controlada de urea al sustrato acorta el periodo de cultivo de 35 a 28 días en *Pleurotus spp*, a la vez que aumenta la productividad de los hongos [34]. Dado que la propagación del micelio dentro del sustrato de cultivo requiere al menos un mes para cultivar estos hongos, una mejora en la tasa de crecimiento del micelio significa una enorme reducción en el coste de producción [35].

No obstante, aunque la adición de nitrógeno aumente el rendimiento, por encima de un determinado nivel inhibe la fructificación [34]. Aunado a ello, las soluciones de nutrientes, generalmente nitrato de amonio (NH_4NO_3), consisten en altas concentraciones de nitrógeno que se disocian y volatilizan, perdiendo así entre 40-70% del suplemento añadido, disminuyendo la efectividad en la que se le adicionan nutrientes al cultivo, y provocando contaminación medioambiental [36]. El consumo de fertilizantes nitrogenados en forma de urea ha aumentado casi 30% desde la revolución agrícola de 1960, no obstante, el aumento de la producción de alimentos a través de la aplicación excesiva de nitrógeno es responsable del 80% del aumento de N_2O atmosférico (un gas de efecto invernadero) que causa el aumento de la temperatura atmosférica y por lo tanto contribuye al calentamiento global [37]

Estas pérdidas son significativas, ya que disminuyen la asimilación de los nutrientes y mantienen abierto el ciclo de nutrientes que el cultivo de *P. ostreatus* busca cerrar. Por ende, es necesario desarrollar estrategias que permitan liberar/descargar fuentes de nitrógeno de manera eficiente, tal como la urea o el nitrato de amonio, permitiendo el aprovechamiento

en el sustrato y evitando su volatilización, garantizando un mayor aprovechamiento de los nutrientes para el cultivo de *P. ostreatus*, aumentando así su eficiencia biológica.

1.4 Nanotecnología

La nanotecnología es una de las nuevas ciencias emergentes en el estudio de los materiales, que tiene el potencial de reemplazar las micro tecnologías convencionales [38] al permitir el estudio de fenómenos inéditos que ocurren a escala atómica y molecular [39]. Conforme se adentra al mundo nanoscópico, y al pasar la escala de los 100 nm, es posible observar cambios distintivos en las propiedades de la materia [38]; debido a esto, el interés en la síntesis de nanomateriales ha aumentado con el fin de aprovechar las nuevas propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas y químicas de estos nanomateriales.

Muchas técnicas han sido desarrolladas con el fin de sintetizar y fabricar materiales nanoestructurados con forma, tamaño, dimensiones y estructura controlados [38]. En el presente se distinguen dos alternativas: Top-Down y Bottom-Up (Figura 3).

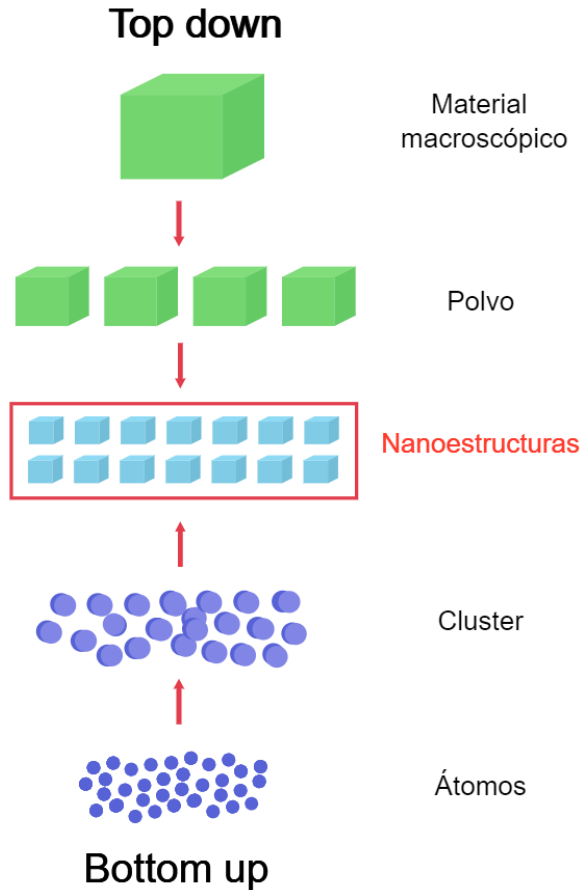


Figura 3. Diagrama esquemático de los enfoques Top-Down y Bottom-Up. Adaptado de [38].

Se denomina ‘bottom up’ a las tecnologías que ensamblan estructuras pequeñas para hacer estructuras mayores (supramoléculas, nanorobots). También llamado método de abajo hacia arriba pertenece a la nanotecnología molecular y se centra en la construcción de estructuras y objetos a partir de sus componentes atómicos y moleculares [39]. Empieza con “nano bloques” de átomos o moléculas que son armados en la estructura requerida [40], permitiendo que la materia pueda controlarse de manera precisa a escala nanométrica, siendo esta metodología acogida como el enfoque principal de la nanotecnología. Usa procesos de autoensamblaje para obtener arquitecturas supramoleculares ordenadas o en estado sólido, a partir de la escala atómica hacia la escala mesoscópica [39].

En el Top-Down, a diferencia del Bottom-Up, se inicia con una pieza grande de material y a través de grabado o molienda se obtiene de ella una nanoestructura mediante la

remoción del material [39]; trata de diseñar y miniaturizar el tamaño de estructuras para obtener a nanoescala sistemas funcionales [41].

1.4.1 Aplicaciones en la agricultura

En la última década, se ha llegado al acuerdo de que las estrategias y tecnologías utilizadas convencionalmente en la agricultura no podrán aumentar su productividad en años venideros, lo que exige la necesidad de adoptar tecnologías modernas que se centren en la mejora de la producción agrícola. El crecimiento sostenible de la agricultura puede acelerarse en gran medida con técnicas nuevas, inteligentes e innovadoras como la nanotecnología [42]. La nanotecnología se ha utilizado en muchos campos de la ciencia como la física, química, ciencia farmacéutica, ciencia de los materiales y medicina, entre otros. Los prometedores resultados obtenidos en otros campos han abierto muchas posibilidades también en el campo de la agricultura [37].

El desarrollo que busca la agricultura para aumentar su rendimiento puede ser logrado por medio del uso efectivo de la nanotecnología [43]. Hoy en día, la nanotecnología es ampliamente utilizada en la agricultura moderna, haciendo uso de nanoestructuras con una o más dimensiones del orden de 100 nm o menos, entre las que se incluyen nanopartículas, nanocargadores y nanomateriales. Estas nanoestructuras encuentran aplicaciones en la nutrición y protección de plantas debido a sus propiedades extraordinarias como elevada relación superficie/volumen, estabilidad coloidal y pequeño tamaño, entre otros [44].

Se han publicado diversos estudios en los que señalan efectos en la mejora de los parámetros de crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos [37] de tomate [45], maíz [46] y vid [47], entre muchos otros, mediante el uso de nanofertilizantes. Estos proporcionan un suministro inteligente de nutrientes a las plantas y demuestran su eficacia en términos de productividad de los cultivos y sostenibilidad medioambiental frente a los costosos fertilizantes químicos [48]. Sin embargo, aún no se ha informado de suplementos de tamaño nanométrico desarrollados para el cultivo de hongos, excepto por [49].

A pesar de que los productos agroquímicos tales como los suplementos desempeñan un papel importante en la producción agrícola, más del 90% de estos productos químicos no

llegan a su objetivo [50]. Esto no sólo supone un desperdicio de capital, sino también un grave peligro para el medio ambiente, ya que afecta a los ecosistemas terrestres y acuáticos.

Con el avance de la investigación centrada en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos en el campo biomédico, las formulaciones de liberación controlada han despertado recientemente interés en el campo de la agricultura, lo que reduce la cantidad de producto químico que debe aplicarse en el cultivo; libera el producto agroquímico de forma retardada para un impacto prolongado y se dirige a los patógenos de una manera sistemática que no daña a otros organismos [50]. Cada cierto tiempo se han introducido/desarrollado diversos materiales y técnicas de suministro para garantizar la encapsulación de diferentes ingredientes químicos para aplicaciones específicas [50], [51], [52], lo que podría ser de cierta importancia para idear las estructuras de suministro adecuadas también para aplicaciones agrícolas.

1.5 Sistemas de liberación controlada: nanoencapsulaciones

El principio básico de la encapsulación es un material de pared que rodea un ingrediente activo destinado a una acción y/o suministros definidos. La encapsulación mejora la eficacia del principio activo y lo protege contra reacciones nocivas, actuando como barrera física contra el oxígeno, la luz, los ácidos y las enzimas, entre otros [52]. La técnica de nanoencapsulación consiste en la síntesis, caracterización y aplicación de sistemas de administración nanométricos con al menos una dimensión inferior a 100 nm [53] (Figura 4). Las nanoencapsulaciones han demostrado desempeñar un papel vital en la reducción de la lixiviación y la evaporación de sustancias nocivas en la agricultura [37] al mejorar la asimilación de nutrientes y disminuir la volatilización de estos.

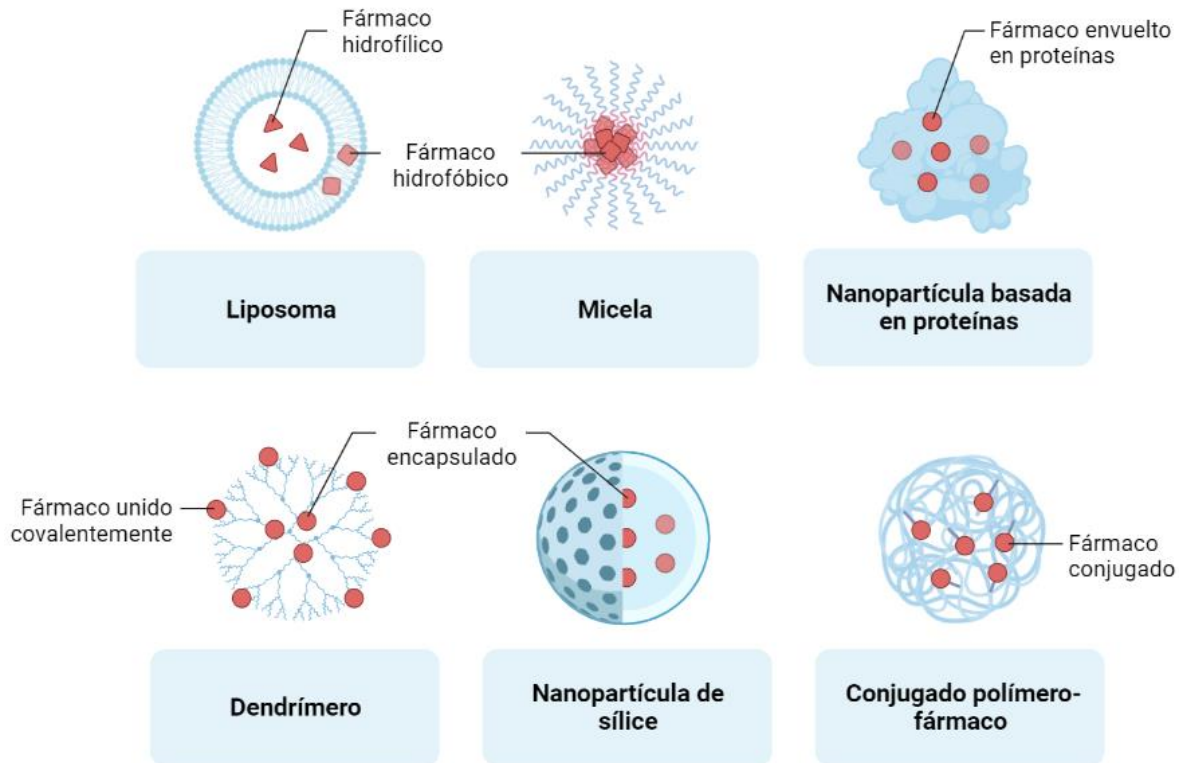


Figura 4. Estructuras utilizadas como nanocargadores. Adaptado de [49].

Entre los sistemas de liberación disponibles a nanoescala, los liposomas son un tipo de nanoencapsulaciones capaces de transportar compuestos biológicamente activos y terapéuticos que muestran una carga eficiente del compuesto, estabilidad biológica, cinética de liberación controlable y biocompatibilidad; estas características proporcionan a los liposomas propiedades farmacocinéticas avanzadas y una biodistribución favorable del compuesto en comparación con otros sistemas de transporte de fármacos [49]. Los liposomas son vesículas artificiales de forma esférica (Figura 5) que pueden ser creados a partir de colesterol y fosfolípidos naturales no tóxicos. Su tamaño en el orden de los nanómetros y hasta los micrómetros, además de su carácter anfipático, así como su biocompatibilidad, hace de los liposomas un sistema prometedor en la encapsulación y liberación de fármacos de interés [54].

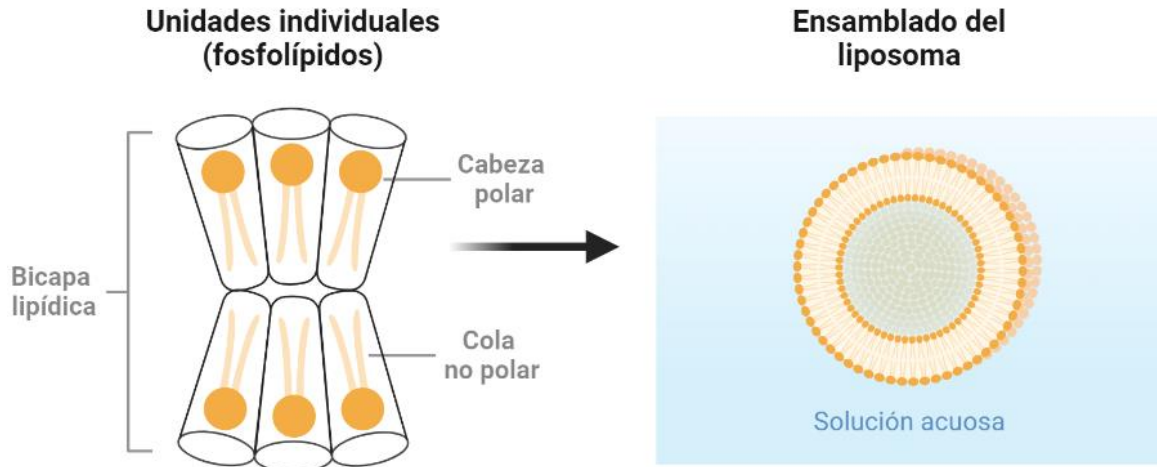


Figura 5. Unidades individuales y formación de un liposoma. Adaptado de [55].

Por lo antes mencionado, en este trabajo se pretende utilizar urea encapsulada de liposomas para utilizarla como suplemento en el cultivo del hongo *P. ostreatus* y ver su efecto en la producción de cuerpo fructífero.

2. Justificación

Dado que se trata de uno de los métodos más factibles y económicos para la bioconversión de residuos lignocelulósicos, el cultivo de *P. ostreatus* representa un proceso de importancia biotecnológica con aplicaciones medioambientales que contribuye con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Organización de las Naciones Unidas. De esta manera, se ha buscado aumentar el rendimiento y productividad del hongo mediante la adición de suplementos de nitrógeno al sustrato empleado para su cultivo con el fin de alcanzar una relación carbono/nitrógeno que permita un rápido y óptimo crecimiento. No obstante, las soluciones utilizadas tradicionalmente, como la urea, se disocian y volatilizan, disminuyendo el número de nutrientes disponibles para el cultivo, suponiendo un desperdicio de recursos, y un grave peligro para ecosistemas terrestres y acuáticos.

Hasta la fecha, los intentos de solucionar dicha problemática siguen reflejando pérdidas de más del 30% del suplemento de nitrógeno añadido, lo que representa pérdidas significativas para la fungicultura y un grave peligro para el medio ambiente. En este ámbito, los recientes avances de liberación controlada de fármacos de interés mediante nanoencapsulaciones se presentan como una solución ante los problemas de volatilización del nitrógeno, donde la liberación regulada de un agroquímico, así como un control de sus concentraciones finales, permitiría ahorrar recursos y proteger al medio ambiente mediante el uso de menores concentraciones de suplemento de nitrógeno.

Mejorar la productividad y eficiencia biológica de *P. ostreatus* involucra aumentar el aprovechamiento de los nutrientes a la vez que se disminuye su volatilización, realizable con ayuda de nanoencapsulaciones. A pesar de que se trata de un área de oportunidad de gran relevancia, hasta la fecha no se ha informado el efecto de nanoencapsular fuentes de nitrógeno y su liberación en *P. ostreatus*, dos de los obstáculos reportados para su cultivo y producción eficiente. En consecuencia, el presente estudio pretende investigar el efecto de urea encapsulada en liposomas, en tratamientos de distintas concentraciones, en el cuerpo fructífero de *P. ostreatus*.

3. Hipótesis

El uso de liposomas cargados con urea como suplementos en el cultivo de *P. ostreatus* posiblemente aumentará el aprovechamiento del nitrógeno y se verá reflejado en la producción del cuerpo fructífero del hongo.

4. Objetivos

4.1 General

Analizar el efecto de los suplementos basados en liposomas cargados con urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ en la producción de cuerpo fructífero de *P. ostreatus*.

4.2 Específicos

1. Sintetizar liposomas cargados con urea comercial
2. Caracterizar los liposomas mediante DLS y UV-Vis
3. Suplementar los liposomas cargados con urea al sustrato de cultivo de *P. ostreatus*.
4. Analizar el efecto de los suplementos de urea en el crecimiento del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*

5. Metodología

5.1 Síntesis de liposomas

Se llevó a cabo por el método de inyección de solventes adaptado de [47], [48] (Figura 6). En este, se agregaron lecitina de soya (Food Technology Tradings) y ácido oleico (Sigma Aldrich) en radio molar 2:1 a 60 mL de etanol a 40 °C bajo agitación magnética durante 15 minutos hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla fue inyectada rápidamente con una jeringa 22 G a 300 mL del tratamiento correspondiente a 60 °C con agitación constante. Los tratamientos encapsulados fueron soluciones acuosas de urea al 0.0, 0.75, 1.5 y 3.0% m/v.

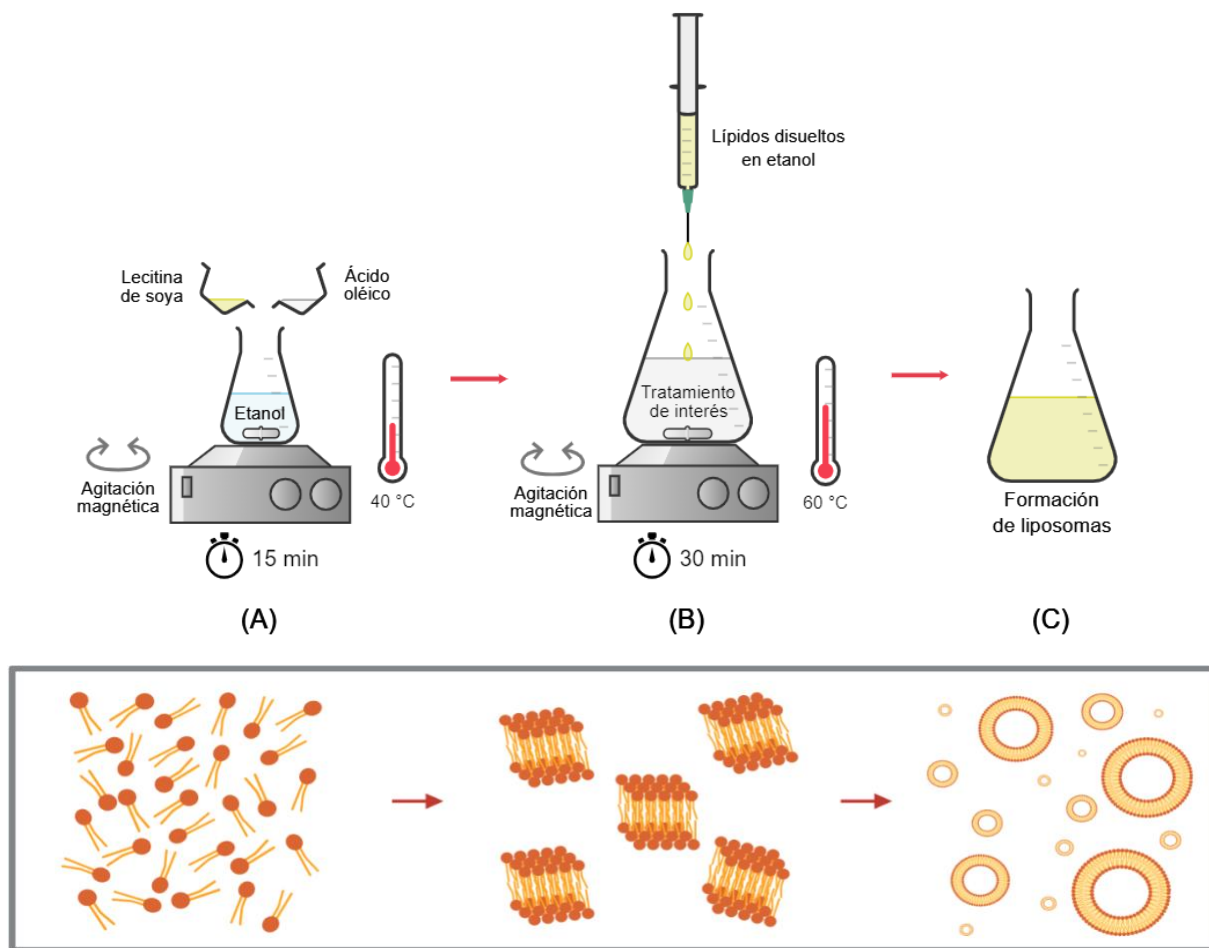


Figura 6. Representación esquemática de las etapas principales del método de inyección de solventes. (A) Una composición de lípidos disueltos en etanol se inyecta en una fase acuosa (B), la cual favorece el autoensamblaje de los componentes lipídicos y la formación de fragmentos planares de bicapa. (C) Por último, la evaporación del etanol favorece la fusión de los fragmentos lipídicos y la formación de vesículas uni y multilamelares cerradas. Adaptado de [58]

5.1.1 Purificación de liposomas

Previo a su purificación, el tratamiento control de liposomas (L-0.00) fue centrifugado a 6,000 g durante 30 minutos a 4 °C, tomando el sobrenadante para su aislamiento con el fin de separar los liposomas de menor tamaño. Cada una de las soluciones encapsuladas fueron purgadas con una atmósfera de N₂ a 20 PSI durante 60 minutos en un tubo de ultrafiltración Amicon, utilizando una membrana de tamaño de poro de 10 kDa MWCO hasta obtener un volumen aproximado de 30 mL (Figura 7). Dicho volumen fue resuspendido en agua destilada hasta obtener un volumen de 100 mL, y fue sometido a filtración bajo las mismas condiciones hasta obtener un volumen final de 30 mL.

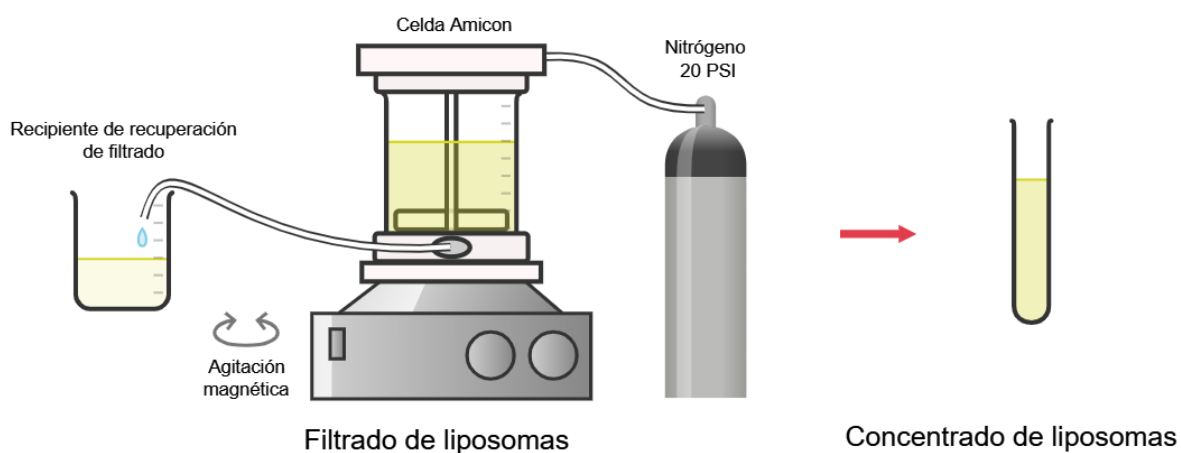


Figura 7. Diagrama esquemático del proceso de concentración de liposomas. Los 300 mL de tratamiento fueron filtrados mediante una celda Amicon hasta obtener un concentrado de 30 mL.

Con el fin de purificar los tratamientos cargados en liposomas de los no encapsulados, se utilizaron bolsas de membrana de diálisis (Spectra/Por Biotech Cellulose Ester (CE) Dialysis Membranes, MWCO: 100-500 Da). Para ello, segmentos de aproximadamente 30 cm de membrana fueron cortados y sumergidos completamente en agua destilada durante 30 minutos; las membranas fueron lavadas con agua destilada, anudadas de un extremo y cargadas con el concentrado de liposomas de cada tratamiento, para finalmente ser sumergidas en agua purificada bajo agitación magnética durante 1 hora. A continuación, se realizó un cambio de agua y se dejó en agitación constante durante 8 horas, repitiendo el

mismo procedimiento y dejando agitar durante 16 horas adicionales, para finalmente recuperar el volumen de las bolsas de cada tratamiento (Figura 8).

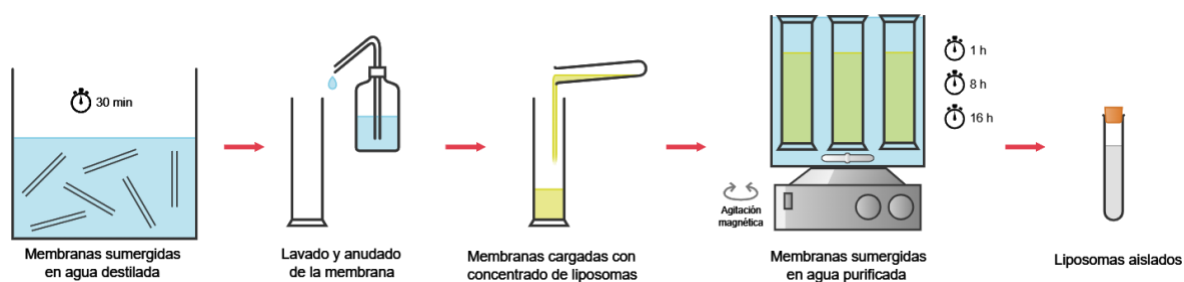


Figura 8. Representación esquemática del proceso de diálisis para el aislamiento de liposomas.

5.2 Caracterización de liposomas

El tamaño y potencial Z de los liposomas fue determinado por medio de dispersión dinámica de luz (*DLS*, por sus siglas en inglés) (Malvern Panalytical, Malvern DTS 1070, folded capillary cell). Para ello, en la celda se cargaron muestras de 25 μL del tratamiento de interés y 975 μL de agua Milli-Q[®]. El tamaño y morfología de los liposomas obtenidos por el método de inyección de solventes fueron determinados por medio de microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) (Nanosurf Easyscan 2, Contact static mode) colocando 15 μL del tratamiento control de liposomas (L-0.00) en un cubreobjetos y dejando secar a temperatura ambiente. Además, la eficiencia de encapsulamiento fue determinada por espectroscopía UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10s), adaptando la metodología de [59], [60]. Para el análisis, se encapsuló una solución de azul de metileno al 0.001% m/v y fue dializada siguiendo la metodología descrita anteriormente. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL de metanol a 1 mL de liposomas aislados con el fin de romper la capa lipídica, y se midió la absorbancia a 660 nm, utilizando la ley de Beer-Lambert (Ec. 1) para determinar la cantidad de azul de metileno encapsulado.

$$C = \frac{A}{\epsilon l} \quad (\text{Ec. 1})$$

, donde C es la concentración de la disolución, A es la absorbancia de la disolución a una longitud de onda dada, ϵ es el coeficiente de extinción molar ($7.15 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y l la

longitud de paso de la celda (1 cm). La eficiencia de encapsulamiento (EB) de los liposomas cargados con azul de metileno mediante el método de inyección de solventes fue determinada mediante la Ec. 2.

$$EB (\%) = \frac{AM \text{ encapsulado}}{AM \text{ inicial}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

5.3 Cultivo de *P. ostreatus*

5.3.1 Preparación del sustrato

Se utilizó cartón recuperado de los desechos producidos por UABC Campus Unidad Ensenada como sustrato, el cual fue recortado hasta obtener cuadros de 10 mm de lado. Se ajustó el pH agregando 80 g de CaCO₃ (grado alimenticio) por cada kilogramo de sustrato, y fue humedecido agregando el tratamiento correspondiente (Tabla 1) en una razón 1.1:1 con el sustrato.

Tabla 1. Tratamientos utilizados para el cultivo de *P. Ostreatus*. L y U indican liposomas cargados con urea y urea libre, respectivamente. L-0.00 y U-0.00 indican tratamientos control realizados con agua.

Tratamiento	Identificador	Concentración de urea (% m/v)
Liposomas	L-0.0	0.0
	L-0.75	0.75
	L-1.5	1.5
	L-3.0	3.0
Libre	U-0.0	0.0
	U-0.75	0.75
	U-1.5	1.5
	U-3.0	3.0

La inoculación del sustrato se llevó a cabo en frascos de vidrio de 16 oz como contenedores con el fin de reemplazar las bolsas de polipropileno desechables y disminuir los residuos generados por el proyecto. En estos, se agregó el sustrato con tratamiento y fue inoculado con *P. ostreatus* en semilla de sorgo (AAC Biolab) a una tasa de 10% (20 g de semilla por cada 200 g de sustrato). Se realizaron réplicas en triplicado por cada tratamiento.

El sustrato inoculado fue incubado durante aproximadamente 30 días en oscuridad a 26 °C. El intercambio de gases fue facilitado mediante 5 orificios perforados en las tapas de los frascos, así como Parafilm para evitar la contaminación.

5.3.2 Formación de primordios

Una vez el micelio colonizó por completo el sustrato, se estimuló la formación de primordios moviendo los frascos a una cámara con temperaturas de 10-15 °C, 60-80% humedad, niveles de CO₂ menores a 500 ppm y 12 horas de luz. Las tapas fueron removidas y el papel Parafilm cambiado con el fin de evitar contaminación.

5.3.3 Crecimiento del cuerpo fructífero

Una vez visualizados primordios y nudos hifales, se removió el papel Parafilm de los frascos para permitir el crecimiento del hongo. En los casos en que la capa de micelio se secó, se realizaron heridas mecánicas con el fin de estimular el crecimiento de hifa fresca. Los frascos fueron rociados todos los días con agua, manteniendo niveles de humedad entre el 60-80%. Transcurridos 7 días después de la formación de primordios, las setas fueron cosechadas del frasco, donde se registró su peso antes de ser almacenadas a 5 °C, mientras que el frasco fue devuelto a la cámara de crecimiento de cuerpo fructífero. La eficiencia biológica fue calculada mediante la Ec. 3:

$$EB\% = \frac{\text{Peso del hongo cosechado}}{\text{Peso del sustrato seco utilizado}} \cdot 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

5.4 Análisis estadístico

Los datos del peso cosechado fueron analizados utilizando el software estadístico Minitab mediante ANOVA de un factor y optimización de respuesta.

6. Resultados y discusión

6.1 Caracterización de liposomas

Los liposomas sintetizados se presentan en la imagen de la Figura 9. Estos presentan un color blanco y consistencia turbia, lo que indica la correcta formación de liposomas [61]. Los resultados obtenidos para la caracterización fisicoquímica de los tratamientos con liposomas por DLS se presentan en la Tabla 2. Los liposomas presentaron diámetros entre los 22.87nm y 247.27 nm, donde los liposomas cargados de agua (L-0.00) presentaron el menor diámetro en comparación al resto de los tratamientos, mientras que el tratamiento cargado con urea al 3% (L-3.00), fue el que presentó un mayor diámetro, con 157.27 nm. La diferencia de tamaño entre ambos tratamientos se asocia al proceso de centrifugación al que fue sometido L-0.00, donde al desechar el pellet formado, se descartaron los liposomas de mayor tamaño que se conglomeran, manteniendo así los liposomas más ligeros y de menor tamaño.



Figura 9. Consistencia de los liposomas cargados de urea tras ser sintetizados (izq.) y después de dializar (der.). Se observa una consistencia turbia lechosa que aumenta tras el dializado.

El tamaño de los liposomas se encuentra relacionado con la rapidez de inyección y agitación, donde se ha reportado que la rápida inyección de la fase lipídica puede producir

una población heterogénea de liposomas [62], además de afectar los valores de PDI. Los valores obtenidos para el índice de polidispersión fueron de 0.42-0.98, lo que caracteriza a los liposomas sintetizados como polidispersos con población heterogénea [63], lo que concuerda con el trabajo de Santos et. al [64], donde encapsularon extractos de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula* en liposomas para estudiar su actividad insecticida, obteniendo índices de polidispersión entre 0.4-0.7, con lo que reportan sistemas heterogéneos donde un menor valor de PDI representa un sistema más monodisperso y menos heterogéneo. Los valores de potencial Z se encontraron entre los -32 y -54 mV, siendo negativos para todos los tratamientos. Estos resultados indican la estabilidad coloidal de los liposomas sintetizados, de acuerdo con Khoshnevisan & Barkhi [65], donde valores de potencial Z mayores a +30 mV y menores a -30 mV son relacionados a una buena estabilidad para las estructuras reportadas.

Tabla 2. Tamaño promedio, índice de polidispersión (PDI) y potencial Z para los tratamientos encapsulados en liposomas. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

Tratamiento	Tamaño promedio (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
L-0.00	22.87 \pm 4.938	0.98 \pm 0.1	-54.1 \pm 1.1
L-0.75	136.44 \pm 8.09	0.42 \pm 0.1	-41.3 \pm 1.1
L-1.50	130.7 \pm 14.41	0.72 \pm 0.1	-41.7 \pm 1.4
L-3.00	157.27 \pm 52.90	0.63 \pm 0.1	-33.8 \pm 0.2

Las imágenes obtenidas por microscopía óptica se presentan en la Figura 10. Aquí se observan estructuras circulares de diferentes tamaños, así como aglomeraciones asociadas con la correcta formación de los liposomas y el agregado de los lípidos empleados.

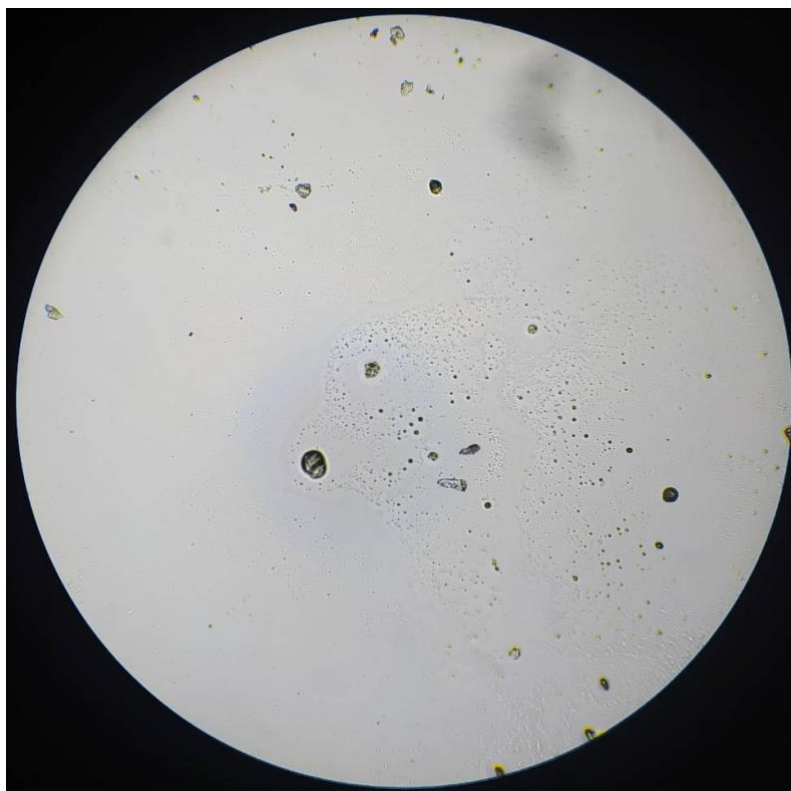


Figura 10. Imagen obtenida por microscopía óptica para L-0.00. La imagen fue capturada con un objetivo 100X.

Las imágenes tridimensionales capturadas por medio de AFM para L-0.00 se presentan en la Figura 11. En estas, se obtuvieron estructuras semi circulares con diámetros entre los 30-150 nm, asociados a la presencia de liposomas. Se esperaba que el diámetro obtenido por medio de AFM fuera considerablemente mayor a los obtenidos por medio de DLS, esto debido a la deformación plana a la que fueron sometidos los liposomas tras ser depositados en el cubreobjetos [66].

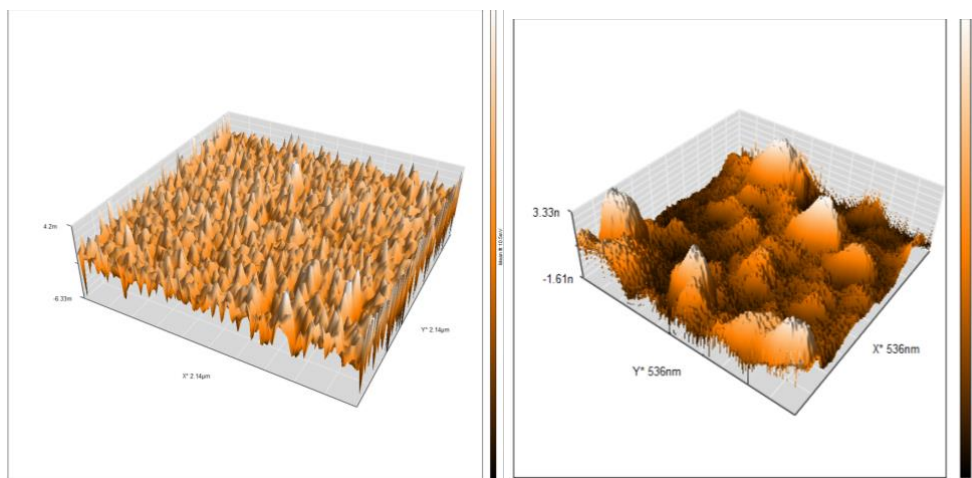


Figura 11. Imágenes tridimensionales obtenidos por AFM de liposomas L-0.00. El área de exploración es de $2.14 \times 2.14 \mu\text{m}$ (Izq.) y $536 \times 536 \text{ nm}$ (der.).

La prueba de encapsulación de azul de metileno dio como resultado una eficiencia de encapsulamiento del 80.69%, lo que indica que el método de inyección de solventes permitió la encapsulación de la mayoría del tratamiento de interés. Esto concuerda con lo reportado por Lombardo [58] y Jaafar-Maalej [67], donde la encapsulación de dipropionato de beclometasona y tamoxifen por el método de inyección de solventes presenta una eficiencia de encapsulamiento de 80-100% y 60-86%, respectivamente. La diferencia entre los porcentajes de encapsulamiento obtenidos contra los reportados podría ser explicada por la concentración de lípidos utilizada en cada síntesis, donde los resultados reportados fueron obtenidos utilizando concentraciones lipídicas de 4-7 mg/mL, mientras que las utilizados en el presente estudio fueron de 2.91 mg/mL.

6.2 Cultivo de *P. ostreatus*

Todos los tratamientos duraron 1 mes en completa oscuridad a $26 \text{ }^\circ\text{C}$, no obstante, transcurridos los 30 días, sólo U-0.75-1, L-0.75-1, L-1.50-1 y L-3.00-1 presentaron colonización total del sustrato (Figura 12), por lo que fueron transferidos a una cámara con temperaturas de $10\text{-}15 \text{ }^\circ\text{C}$, 60-80% humedad, niveles de CO_2 menores a 500 ppm y 12 horas de luz., mientras que el resto de los frascos con tratamiento se mantuvieron en incubación hasta presentar colonización completa del sustrato. Transcurridos 7 días en cámara, se

observó la presencia de pines y primordios en los tratamientos L-3.00-1 y L-1.50-1, y 7 días posteriores, la formación de setas maduras (Figura 13). El experimento concluyó 90 días después de iniciarse, no obstante, no todos los tratamientos cultivados presentaron colonización del micelio, ni tampoco producción del cuerpo fructífero (Figura 14 y 15).



Figura 12. Colonización total del sustrato para los tratamientos L-3.00-1, L-1.50-1, L-0.75-1 y U-0.75-1. El micelio se observa de color blanco, mientras que el sustrato de color café.



Figura 13. Cuerpo fructífero de U-0.75-1 previo a su cosecha.

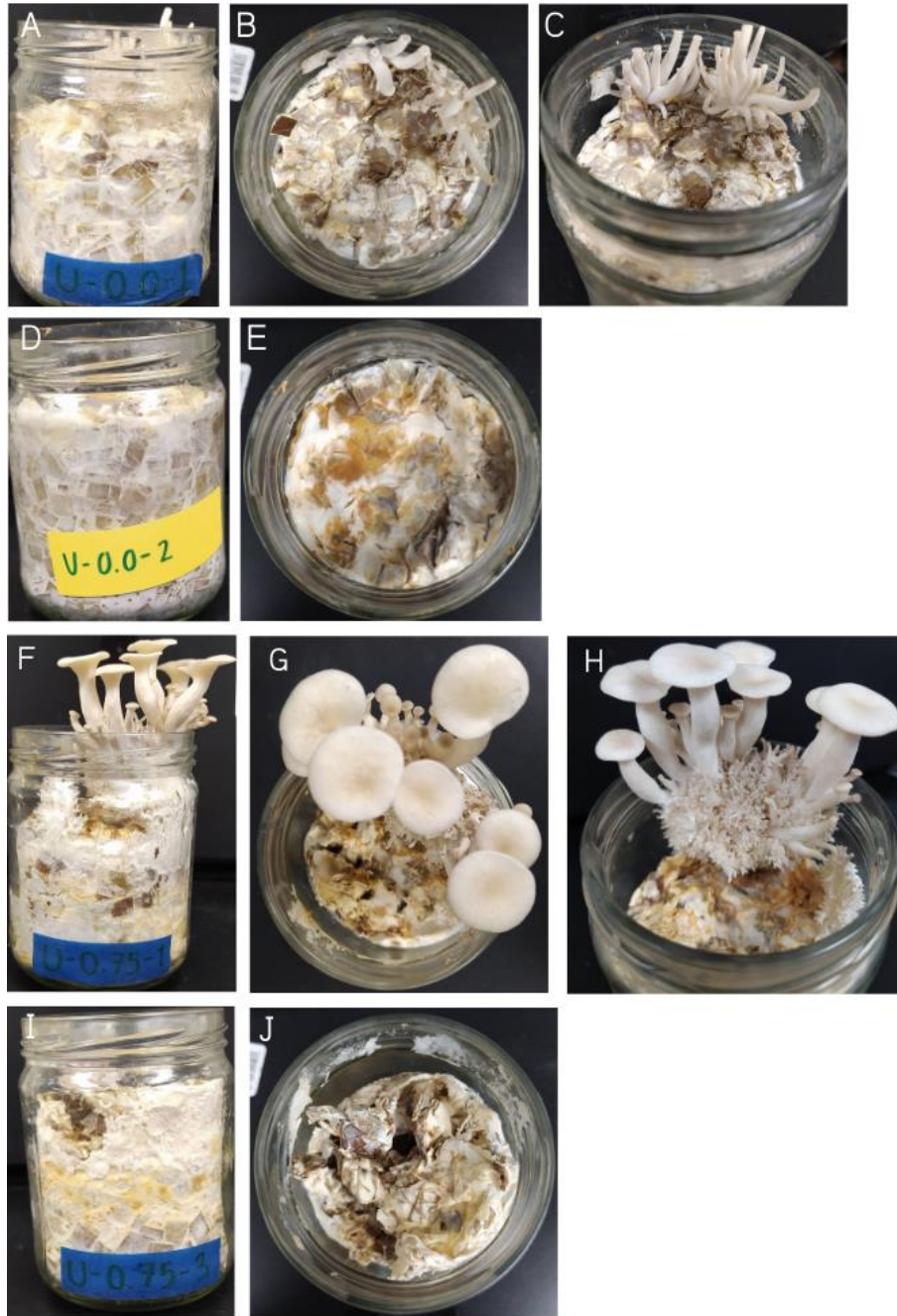


Figura 14. Crecimiento del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* suplementado con urea libre a diferentes tratamientos. Se presentan las vistas frontal, superior y enfocada en el crecimiento de la seta para U-0.00-1 (A-C), U-0.00-2 (D-E), U-0.75-1 (F-H) y U-0.75-3 (I-J).

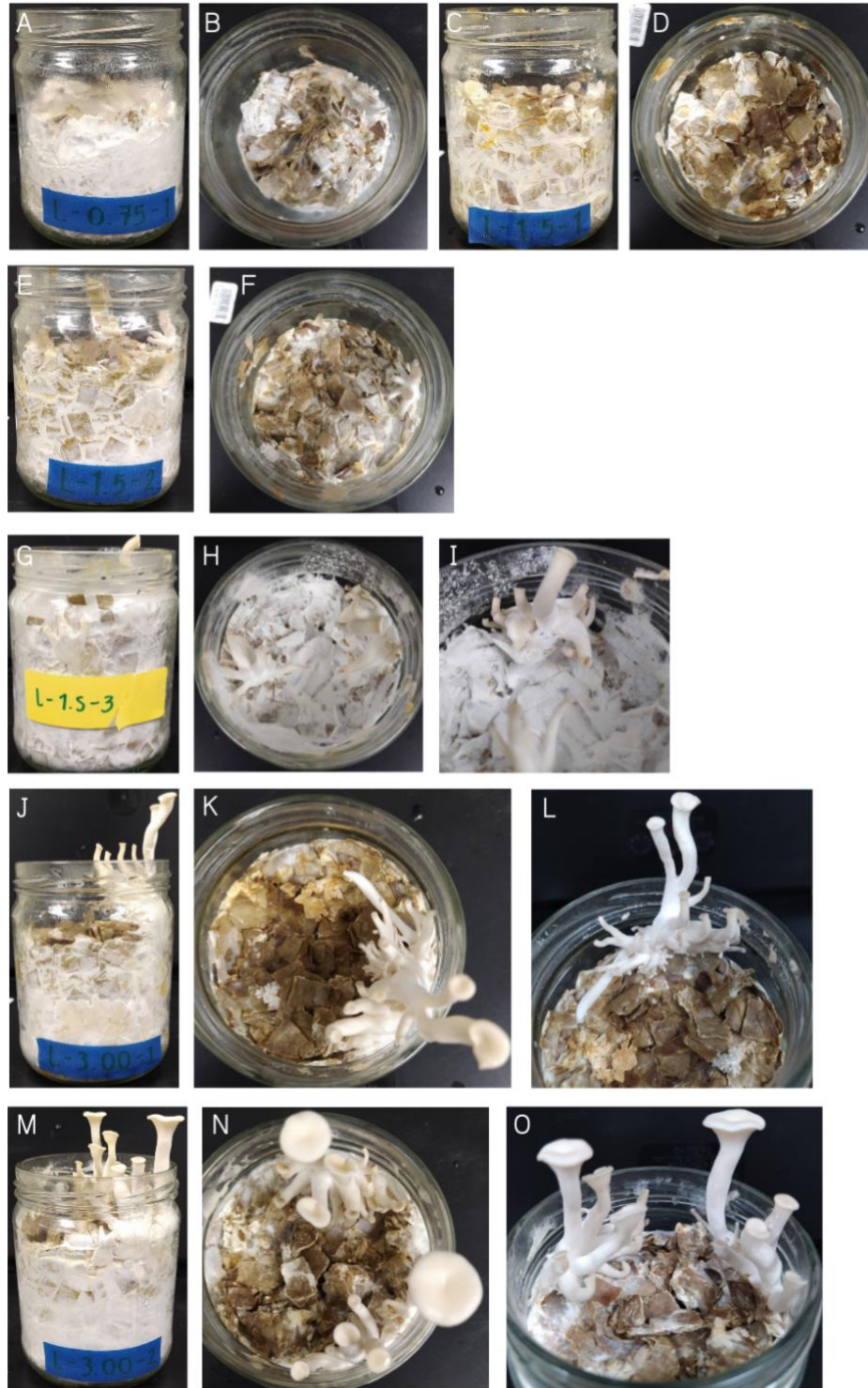


Figura 15. Crecimiento del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* suplementado con urea encapsulada en liposomas a diferentes tratamientos. Se presentan las vistas frontal, superior y enfocada en el crecimiento de la seta para L-0.75-1 (A-B), L-1.50-1 (C-D), L-1.50-2 (E-F), L-1.50-3 (G-I), L-3.00-1 (J-L) y L-3.00-2 (M-O).

De las 24 repeticiones cultivadas, 14 tratamientos presentaron contaminación durante la carrera de micelio, por lo que dichos tratamientos fueron esterilizados y retirados del experimento (Figura 16). El crecimiento de los tratamientos restantes se resume en la Tabla 3 y la Figura 17.

Tabla 3. Crecimiento del cuerpo fructífero para los diferentes tratamientos suplementados.

Tratamiento	Repetición	Peso (g)	Tratamiento	Repetición	Peso (g)
L-0.0	1	0.000	U-0.0	1	28.309
	2	0.000		2	15.069
	3	0.000		3	0.000
L-0.75	1	0.000	U-0.75	1	51.869
	2	0.000		2	30.933
	3	0.000		3	70.451
L-1.5	1	53.470	U-1.5	1	0.000
	2	17.246		2	0.000
	3	13.972		3	0.000
L-3.00	1	65.298	U-3.00	1	0.000
	2	46.520		2	0.000
	3	0.000		3	0.000

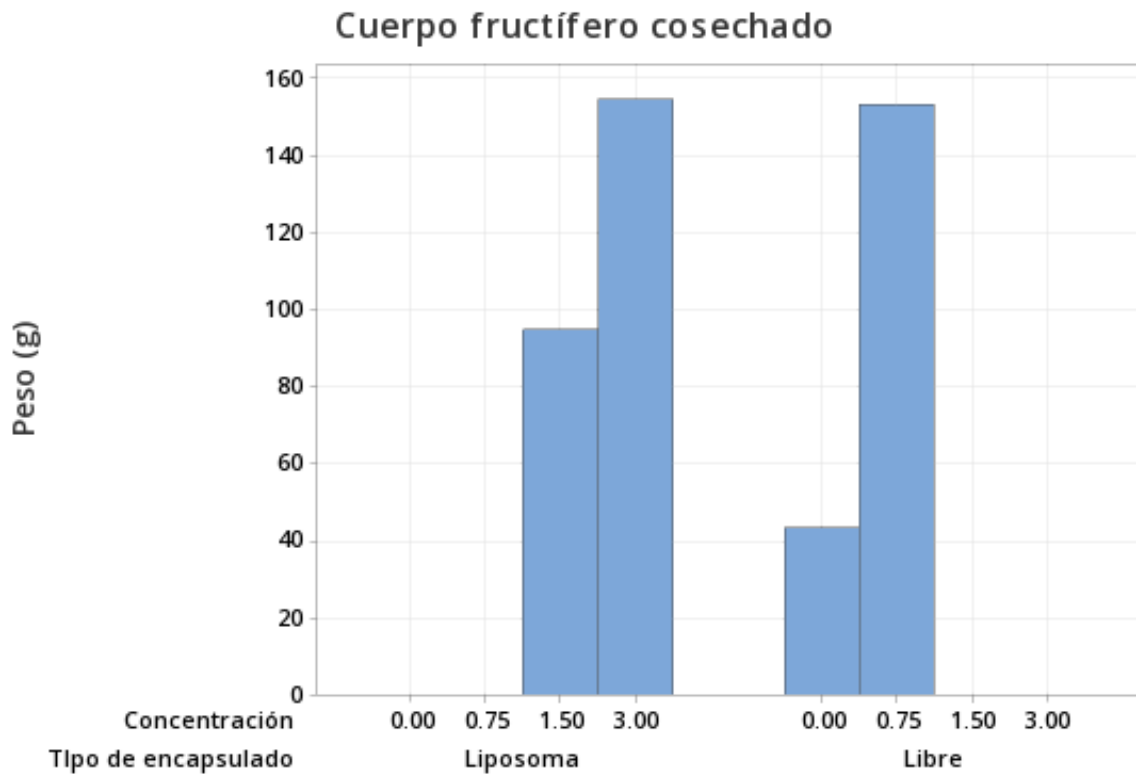


Figura 16. Gráfico de crecimiento total en peso (g) para el cuerpo fructífero de *P. ostreatus* en función del tipo de tratamiento utilizado.

6.3 Análisis estadístico

El análisis descriptivo para los tratamientos encapsulados y no encapsulados se presenta en las tablas 4 y 5. Para los tratamientos no encapsulados, el peso promedio para las concentraciones de 0.00% y 0.75% fue de 14.46 g y 51.1 g, respectivamente, mientras que para los tratamientos encapsulados se obtuvo un peso promedio para las concentraciones de 1.50% y 3.00% de 31.6 g y 51.53 g, respectivamente. El gráfico de caja y bigotes correspondiente se presenta en la Figura 17.

Tabla 4. Estadística descriptiva para los tratamientos libres (no encapsulados).

Concentración	N	Media	σ	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
0	3	14.46	14.16	0	0	15.07	28.31	28.31
0.75	3	51.1	19.8	30.9	30.9	51.9	70.5	70.5
1.5	3	0	0	0	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 5. Estadística descriptiva para los tratamientos encapsulados en liposomas.

Concentración	N	Media	σ	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
0	3	0	0	0	0	0	0	0
0.75	3	0	0	0	0	0	0	0
1.5	3	31.6	19.3	17.2	17.2	24	53.5	53.5
3	3	51.53	12.07	42.76	42.76	46.52	65.3	65.3

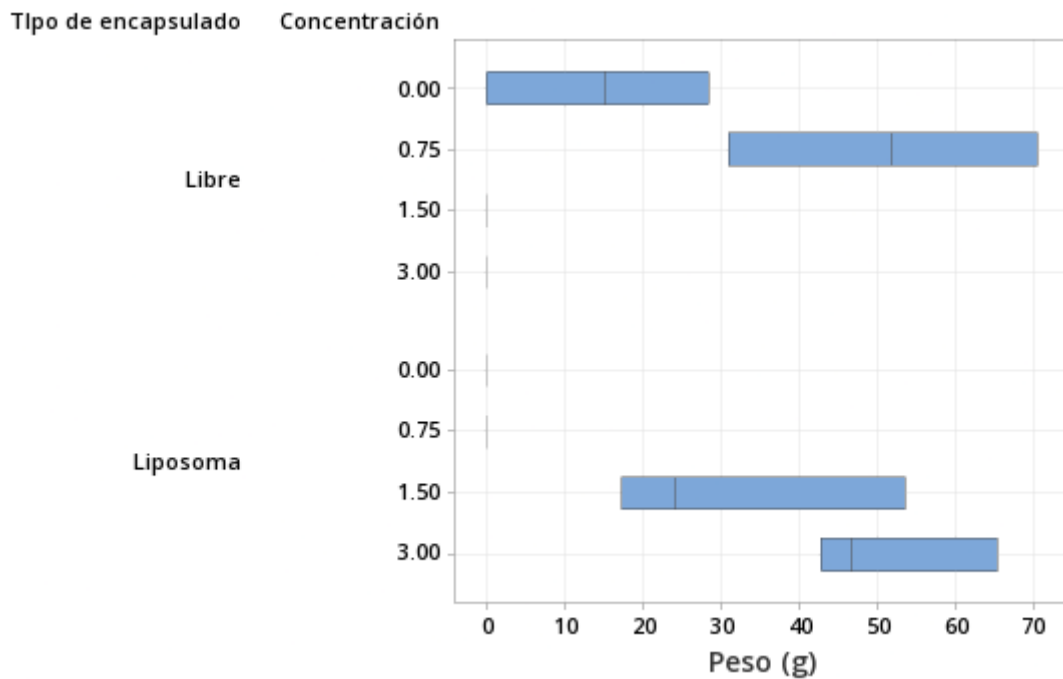


Figura 17. Diagrama de caja y bigotes para los pesos obtenidos del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* a diferentes tipos de encapsulado y concentraciones.

La eficiencia biológica calculada para para los tratamientos encapsulados y no encapsulados se presenta en la tabla 6. El máximo porcentaje fue obtenido para el tratamiento de urea al 3.00% m/v encapsulado en liposomas con 56.21% de eficiencia biológica, mientras que el tratamiento que presentó menor porcentaje de eficiencia biológica fue el de urea libre al 0.00% con 15.77%. Esto concuerda con lo reportado por [68], donde se obtuvo un porcentaje de eficiencia biológica de 9-23% para tratamientos con sustrato de cartón sin ningún tipo de suplemento de nitrógeno. La diferencia de la eficiencia biológica reportada con la calculada para el presente estudio podría ser asociada con la adición de fuentes de nitrógeno al cultivo de cada uno de los tratamientos.

Tabla 6. Eficiencia biológica de *P. ostreatus* a diferentes tratamientos y concentraciones.

Tratamiento	Concentración	Media (g)	Eficiencia biológica (%)
Libre	0	14.46	15.77
Libre	0.75	51.1	55.75
Liposoma	1.5	31.6	34.47
Liposoma	3	51.53	56.21

No obstante, debido a que varias réplicas de los tratamientos se contaminaron con la presencia de otro hongo, esto generó que el número de réplicas fuera insuficiente para realizar un análisis estadístico robusto que pudiera indicar el efecto de los liposomas cargados de urea en la producción de cuerpo fructífero en *P. ostreatus*. El análisis de optimización de respuesta (Figura 18) predice que el tratamiento que permitirá la máxima respuesta (en peso), será el tratamiento L-3.00, es decir, urea 3% m/v encapsulada mediante liposomas; no obstante, esta predicción sólo puede explicar 50.1% de la respuesta ante los tratamientos. Aunado a ello, presenta $p > 0.05$, por lo que no puede ser aceptado y, por ende, el estudio del efecto del uso de liposomas cargados con urea como suplementos en el cultivo de *P. ostreatus* resulta inconcluso.

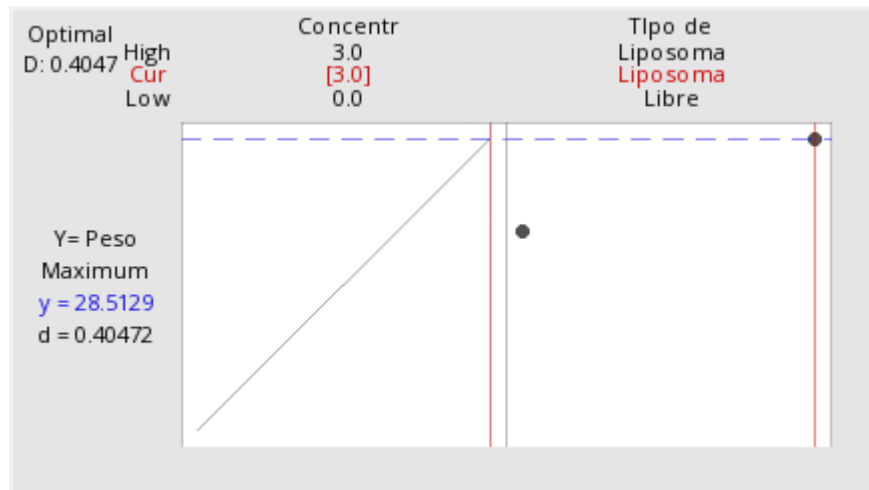


Figura 18. Análisis de optimización de respuesta. L-3.00 se predice como el tratamiento óptimo para lograr el máximo peso posible del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*.

7. Conclusiones

- Se logró la exitosa encapsulación de urea grado comercial en liposomas de escala nanométrica (20-150 nm) con la formación de una suspensión coloidal estable (potencial Z < -33 mV) mediante el método de inyección de solventes. Estos fueron suministrados de manera exitosa en el cultivo de *P. ostreatus*
- Los liposomas fueron caracterizados por medio de DLS, UV-Vis y AFM, permitiendo conocer su tamaño, estabilidad coloidal, eficiencia de encapsulamiento, estructura y morfología.
- La eliminación de las réplicas por contaminación de los cultivos tuvo como consecuencia que no hubiese suficientes datos para la realización de análisis estadísticos por lo cual no fue posible determinar el efecto de la implementación de sistemas liposomales cargados con suplementos de nitrógeno en el cultivo de *P. ostreatus*.

8. Trabajo a futuro

- Se espera examinar el uso de otro tipo de suplementos de nitrógeno en el cultivo de *P. ostreatus*, así como el efecto de nanoencapsularlos y liberarlos de manera controlada. Esto permitiría ahondar en la efectividad de retrasar la liberación de nitrógeno en la producción del cuerpo fructífero de dicho hongo.
- En cuestión de análisis estadísticos, aumentar el número de réplicas y corridas de los experimentos con el fin de tener datos con validez estadística y de relevancia para la investigación.

9. Referencias

- [1] “Solid Waste Management”, The World Bank Organization, 2022. [Online]. Available: <https://www.worldbank.org/en/topic/urbandevelopment/brief/solid-waste-management#:~:text=In%202020%2C%20the%20world%20was,3.88%20billion%20tonnes%20in%202050.>
- [2] “Medio Ambiente: Basura”, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018. [Online]. Available: <https://cuentame.inegi.org.mx/territorio/ambiente/basura.aspx?tema=T>
- [3] “ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DEL MEDIO AMBIENTE (5 DE JUNIO)”, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2020. [Online]. Available: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/ambiente2020_Nal.pdf
- [4] "Mexico wastes 20 million tons of food per year", Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. [Online]. Available: <https://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/en/c/1129783/>.
- [5] J. Becerra, "México desperdicia 20 millones de toneladas de alimentos al año", Excélsior, 2021. [Online]. Available: <https://www.excelsior.com.mx/nacional/mexico-desperdicia-20-millones-de-toneladas-de-alimentos-al-ano/1239155>.
- [6] S. Ummartyotin and H. Manuspiya, “A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 41. Elsevier BV, pp. 402–412, Jan. 2015. doi: 10.1016/j.rser.2014.08.050.
- [7] S. W. Saragih, R. Hardiyanti, and I. P. Mahendra, “ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CELLULOSE NANOFIBERBASED HYDROGELS FROM ABACÁ BANANA PSEUDO-STEM FIBRE,” *Rasayan Journal of Chemistry*, vol. 14, no. 01. Rasayan Journal of Chemistry, pp. 578–583, 2021. doi: 10.31788/rjc.2021.1415883.
- [8] L. Zihare and D. Blumberga, “Market Opportunities for Cellulose Products From Combined Renewable Resources,” *Environmental and Climate Technologies*, vol. 19, no. 1. Walter de Gruyter GmbH, pp. 33–38, May 01, 2017. doi: 10.1515/rtuct-2017-0003.
- [9] M. O. Akintunde, B. C. Adebayo-Tayo, M. M. Ishola, A. Zamani, and I. S. Horváth, “Bacterial Cellulose Production from agricultural Residues by two *Komagataeibacter* sp. Strains,” *Bioengineered*, vol. 13, no. 4. Informa UK Limited, pp. 10010–10025, Apr. 01, 2022. doi: 10.1080/21655979.2022.2062970.

- [10] Z. U. Ozola, R. Vesere, S. N. Kalnins, and D. Blumberga, "Paper Waste Recycling. Circular Economy Aspects," *Environmental and Climate Technologies*, vol. 23, no. 3. Walter de Gruyter GmbH, pp. 260–273, Dec. 01, 2019. doi: 10.2478/rtuct-2019-0094.
- [11] N. L. Ma et al., "Green application and toxic risk of used diaper and food waste as growth substitute for sustainable cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*)," *Journal of Cleaner Production*, vol. 268. Elsevier BV, p. 122272, Sep. 2020. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122272.
- [12] J. O'Connor, S. A. Hoang, L. Bradney, J. Rinklebe, M. B. Kirkham, and N. S. Bolan, "Value of dehydrated food waste fertiliser products in increasing soil health and crop productivity," *Environmental Research*, vol. 204. Elsevier BV, p. 111927, Mar. 2022. doi: 10.1016/j.envres.2021.111927.
- [13] Mark W. Platt, Y. Hadar, and I. Chet, "Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 20, no. 2. Springer Science and Business Media LLC, Aug. 1984. doi: 10.1007/bf00252594.
- [14] S. Oys, U. Prince, W. G. Sriyanthi, R. Singh, and M. Kumar, "Determination of the Paper Quality as a Substrate for Oyster Mushroom Cultivation" 2020, pp. 117–125.
- [15] T. Tesfay, T. Godifey, R. Mesfin, and G. Kalayu, "Evaluation of waste paper for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with some added supplementary materials," *AMB Express*, vol. 10, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Jan. 18, 2020. doi: 10.1186/s13568-020-0945-8.
- [16] S. Patil, "Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on different agro wastes", *Sci. Res. Rep.*, 2 (3), p. 225-228, Oct. 2012.
- [17] H. Sardar et al., "Deciphering the role of moringa leaf powder as a supplement in the cotton waste substrate for the growth and nutrition of king oyster mushroom," *Scientia Horticulturae*, vol. 293. Elsevier BV, p. 110694, Feb. 2022. doi: 10.1016/j.scienta.2021.110694.
- [18] S. Pointing, "Feasibility of bioremediation by white-rot fungi," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, no. 1–2. Springer Science and Business Media LLC, pp. 20–33, Oct. 01, 2001. doi: 10.1007/s002530100745.
- [19] S. Russel, "The essential guide to cultivating mushrooms: Simple and advanced techniques for growing shiitake, oyster, lion's mane, and maitake mushrooms at home", Storey publishing, p. 21, 2014.

- [20] M. E. Valverde, T. Hernández-Pérez, and O. Paredes-López, “Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life,” *International Journal of Microbiology*, vol. 2015. Hindawi Limited, pp. 1–14, 2015. doi: 10.1155/2015/376387.
- [21] W. A. Wan Mahari et al., “A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 400. Elsevier BV, p. 123156, Dec. 2020. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123156.
- [22] R. C. G. Corrêa, T. Brugnari, A. Bracht, R. M. Peralta, and I. C. F. R. Ferreira, “Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 50. Elsevier BV, pp. 103–117, Apr. 2016. doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.012.
- [23] M. B. Bellettini et al., “Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp.,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, no. 4. Elsevier BV, pp. 633–646, May 2019. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.12.005.
- [24] E. A. Adebayo and D. Martínez-Carrera, “Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 1. Academic Journals, pp. 52–67, Jan. 07, 2015. doi: 10.5897/ajb2014.14249.
- [25] K. Piska, K. Ziája and B. Muszynska, “Edible mushroom *pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom) – Its dietary significance and biological activity”, *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 16(1), 151–161, 2017.
- [26] F. Ahmad Zakil et al., “Growth performance and mineral analysis of *Pleurotus ostreatus* from various agricultural wastes mixed with rubber tree sawdust in Malaysia,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 17. Elsevier BV, p. 100873, Feb. 2022. doi: 10.1016/j.biteb.2021.100873.
- [27] E. P. Contreras, M. Sokolov, G. Mejía, and J. E. Sánchez, “Soaking of substrate in alkaline water as a pretreatment for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*,” *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 79, no. 2. Informa UK Limited, pp. 234–240, Jan. 2004. doi: 10.1080/14620316.2004.11511754.
- [28] S. Paudel and D. Dhakal, “Yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrate,” *Archives of Agriculture and Environmental Science*, vol. 5, no. 2. Agriculture and Environmental Science Academy, pp. 190–195, Jun. 25, 2020. doi: 10.26832/24566632.2020.0502016.
- [29] M. Rizki and Y. Tamai, “Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*),” *World*

- Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 27, no. 7. Springer Science and Business Media LLC, pp. 1695–1702, Dec. 14, 2010. doi: 10.1007/s11274-010-0624-z.
- [30] A. Pardo-Giménez, L. Catalán, J. Carrasco, M. Álvarez-Ortí, D. Zied, and J. Pardo, “Effect of supplementing crop substrate with defatted pistachio meal on *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* production,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 96, no. 11. Wiley, pp. 3838–3845, Feb. 05, 2016. doi: 10.1002/jsfa.7579.
- [31] J. Carrasco, D. C. Zied, J. E. Pardo, G. M. Preston, and A. Pardo-Giménez, “Supplementation in mushroom crops and its impact on yield and quality,” *AMB Express*, vol. 8, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Sep. 18, 2018. doi: 10.1186/s13568-018-0678-0.
- [32] K. Burton and R. Noble, *Understanding Mushroom Nutrition: Project aimed at improving yield, substrate efficiency and utilisation and flavour*. 2015.
- [33] A. Pardo-Giménez, J. Carrasco, J. M. M. Roncero, M. Álvarez-Ortí, D. Cunha Zied, and J. E. Pardo-González, “Recycling of the biomass waste defatted almond meal as a novel nutritional supplementation for cultivated edible mushrooms,” *Acta Scientiarum. Agronomy*, vol. 40, no. 1. Universidade Estadual de Maringa, p. 39341, May 15, 2018. doi: 10.4025/actasciagron. v40i1.39341.
- [34] N. R. Curvetto, D. Figlas, R. Devalis, and S. Delmastro, “Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N–NH₄⁺ and/or Mn(II),” *Bioresource Technology*, vol. 84, no. 2. Elsevier BV, pp. 171–176, Sep. 2002. doi: 10.1016/s0960-8524(02)00013-5.
- [35] C. Y. Lee, J. E. Park, B. B. Kim, S.M. Kim, and H. S. Ro, “Determination of Mineral Components in the Cultivation Substrates of Edible Mushrooms and Their Uptake into Fruiting Bodies,” *Mycobiology*, vol. 37, no. 2, pp. 109–113, Jun. 2009, doi: 10.4489/MYCO.2009.37.2.109.
- [36] D. Daum and M. K. Schenk, “Gaseous nitrogen losses from a soilless culture system in the greenhouse,” *Plant and Soil*, vol. 183, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, pp. 69–78, Jun. 1996. doi: 10.1007/bf02185566.
- [37] S. Duhan, R. Kumar, N. Kumar, P. Kaur, K. Nehra, and S. Duhan, “Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture,” *Biotechnology Reports*, vol. 15. Elsevier BV, pp. 11–23, Sep. 2017. doi: 10.1016/j.btre.2017.03.002.
- [38] P. Beer, “Top-down and bottom-up approaches for synthesis of nanomaterials”, University Meerut, 2004. [Online]. Available: <https://ccsuniversity.ac.in/bridge->

library/pdf/L-
3%20Synthesis%20of%20Nanostructured%20Materials%20Prof%20BPS.pdf

- [39] G. Mendoza and J. Rodríguez-López, “La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso”, *Perfiles latinoamericanos*, 14(29), 161-186, 2007. [Online]. Available: <http://www.scielo.org.mx/pdf/perlat/v14n29/v14n29a6.pdf>
- [40] ICPDE - Scientific Reports on Decision Making, “Nanotechnology: what is it and how will it affect us?”, Catalan Foundation for Research on Equal Opportunity, 2011. [Online]. Available: www.recercat.cat/handle/icpde/icpde-english-2.pdf
- [41] F. Aguayo and J. Lama, “Nanotecnología y Nanoquímica”, Universidad de Sevilla, 2011. [Online]. Available: http://idus.us.es/bitstream/handle/11441/38339/ST_Aguayo_2011_nanotecnologia.pdf
- [42] S. Saranya, R. Aswani, A. Remakanthan, and E. K. Radhakrishnan, “Nanotechnology in Agriculture,” *Nanotechnology for Agriculture*. Springer Singapore, pp. 1–17, 2019. doi: 10.1007/978-981-32-9370-0_1.
- [43] P. S. Preetha and N. Balakrishnan, “A Review of Nano Fertilizers and Their Use and Functions in Soil,” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 6, no. 12. Excellent Publishers, pp. 3117–3133, Dec. 10, 2017. doi: 10.20546/ijcmas.2017.612.364.
- [44] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, and M. R. Wiesner, “Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective,” *Nature Nanotechnology*, vol. 4, no. 10. Springer Science and Business Media LLC, pp. 634–641, Sep. 13, 2009. doi: 10.1038/nnano.2009.242. *Express*, vol. 10, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Oct. 21, 2020. doi: 10.1186/s13568-020-01124-1.
- [45] M. Faizan et al., “Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) induce salt tolerance by improving the antioxidant system and photosynthetic machinery in tomato,” *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 161. Elsevier BV, pp. 122–130, Apr. 2021. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.02.002.
- [46] J. P. Z. Gonçalves, J. Seraglio, D. L. P. Macuvele, N. Padoin, C. Soares, and H. G. Riella, “Green Synthesis of Manganese Based Nanoparticles Mediated by *Eucalyptus robusta* and *Corymbia citriodora* for agricultural applications,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier BV, p. 128180, Dec. 2021. doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.128180.

- [47] A. Sabir, K. Yazar, F. Sabir, Z. Kara, M. A. Yazici, and N. Goksu, "Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations," *Scientia Horticulturae*, vol. 175. Elsevier BV, pp. 1–8, Aug. 2014. doi: 10.1016/j.scienta.2014.05.021.
- [48] S. Babu et al., "Nanofertilizers for agricultural and environmental sustainability," *Chemosphere*. Elsevier BV, p. 133451, Dec. 2021. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133451.
- [49] L. Naim, M. A. Alsanad, N. Shaban, Z. El Sebaaly, S. Abou Fayssal, and Y. N. Sassine, "Production and composition of *Pleurotus ostreatus* cultivated on Lithovit®-Amino25 supplemented spent substrate," *AMB*
- [50] T. A. Wani, F. A. Masoodi, W. N. Baba, M. Ahmad, N. Rahmanian, and S. M. Jafari, "Nanoencapsulation of Agrochemicals, Fertilizers, and Pesticides for Improved Plant Production," *Advances in Phytotechnology*. Elsevier, pp. 279–298, 2019. doi: 10.1016/b978-0-12-815322-2.00012-2.
- [51] T. A. Wani, F. A. Masoodi, and I. A. Wani, "The possible nomenclature of encapsulated products," *Food Chemistry*, vol. 234. Elsevier BV, pp. 119–120, Nov. 2017. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.121.
- [52] T. A. Wani et al., "Suitability of Different Food Grade Materials for the Encapsulation of Some Functional Foods Well Reported for Their Advantages and Susceptibility," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, no. 15. Informa UK Limited, pp. 2431–2454, Jan. 20, 2015. doi: 10.1080/10408398.2013.845814.
- [53] A. K. Chaudhari, V. K. Singh, S. Das, and N. K. Dubey, "Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 149. Elsevier BV, p. 112019, Mar. 2021. doi: 10.1016/j.fct.2021.112019.
- [54] E. Yang, H.-S. Jung, and P.-S. Chang, "Stimuli-responsive polymer-complexed liposome nanocarrier provides controlled release of biomolecules," *Food Hydrocolloids*, vol. 125. Elsevier BV, p. 107397, Apr. 2022. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.107397.
- [55] D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis, and J. Ciccolini, "Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept," *ISRN Pharmaceutics*, vol. 2012. Hindawi Limited, pp. 1–11, Feb. 09, 2012. doi: 10.5402/2012/738432.

- [56] A. Akbarzadeh et al., “Liposome: classification, preparation, and applications,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 8, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Feb. 22, 2013. doi: 10.1186/1556-276x-8-102.
- [57] S. Batzri and E. D. Korn, “Single bilayer liposomes prepared without sonication,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 298, no. 4. Elsevier BV, pp. 1015–1019, Apr. 1973. doi: 10.1016/0005-2736(73)90408-2.
- [58] D. Lombardo and M. A. Kiselev, “Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 3. MDPI AG, p. 543, Feb. 28, 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14030543.
- [59] Singh, “Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes,” *International Journal of Nanomedicine*. Informa UK Limited, p. 101, Feb. 2010. doi: 10.2147/ijn.s8030.
- [60] M. SİLİNDİR GÜNAY, “The Formulation of Methylene Blue Encapsulated, Tc-99m Labeled Multifunctional Liposomes for Sentinel Lymph Node Imaging and Therapy,” *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 17, no. 4. Galenos Yayınevi, pp. 381–387, Aug. 28, 2020. doi: 10.4274/tjps.galenos.2019.86619.
- [61] O. H. Voss, H. Lee, L. Tian, K. Krzewski, and J. E. Coligan, “Liposome Preparation for the Analysis of Lipid-Receptor Interaction and Efferocytosis,” *Current Protocols in Immunology*, vol. 120, no. 1. Wiley, Jan. 2018. doi: 10.1002/cpim.43.
- [62] C. Sebaaly, H. Greige-Gerges, S. Stainmesse, H. Fessi, and C. Charcosset, “Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method,” *Food Bioscience*, vol. 15. Elsevier BV, pp. 1–10, Sep. 2016. doi: 10.1016/j.fbio.2016.04.005.
- [63] V. Kunasekaran and K. Krishnamoorthy, “Experimental Design for the Optimization of Nanoscale Solid Lipid Particles Containing Rasagiline Mesylate,” *Journal of Young Pharmacists*, vol. 7, no. 4. EManuscript Technologies, pp. 285–295, Jul. 17, 2015. doi: 10.5530/jyp.2015.4.2.
- [64] P. Cristina e Santos et al., “Insecticidal activity of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* extracts and fractions free and microencapsulated,” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 45. Elsevier BV, p. 102511, Oct. 2022. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102511.
- [65] K. Khoshnevisan and M. Barkhi, “Information about Zeta Potential.” Institute of Agricultural Biotechnology, Nano Department, 2015. doi: 10.13140/RG.2.1.4554.3844.

- [66] Y. Muraji, T. Fujita, H. Itoh, and D. Fujita, "Preparation Procedure of Liposome-Absorbed Substrate and Tip Shape Correction of Diameters of Liposome Measured by AFM," *Microscopy Research*, vol. 01, no. 03. Scientific Research Publishing, Inc., pp. 24–28, 2013. doi: 10.4236/mr.2013.13005.
- [67] C. Jaafar-Maalej, R. Diab, V. Andrieu, A. Elaissari, and H. Fessi, "Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation," *Journal of Liposome Research*, vol. 20, no. 3. Informa UK Limited, pp. 228–243, Nov. 09, 2009. doi: 10.3109/08982100903347923.
- [68] M. Owaid, A. Abed, and B. Nassar, "Recycling cardboard wastes to produce blue oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* in Iraq," *Emirates Journal of Food and Agriculture*, vol. 27, no. 7. Faculty of Food and Agriculture, United Arab Emirates University, p. 537, 2015. doi: 10.9755/ejfa.2015.04.118.