



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería Arquitectura y
Diseño



“Efectividad de liposomas cargados con nitrato de amonio (NH_4NO_3) para su uso como suplemento en el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*”

TESIS

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

Ingeniero en Nanotecnología

Presenta

Javier Armenta Cortez

Director de tesis:

Dra. Haydee López Rodríguez

Codirector de tesis:

M. I. Guillermo Amaya Parra

Ensenada Baja California, junio de 2021.

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

**“Efectividad de liposomas cargados con nitrato de amonio
(NH₄NO₃) para su uso como suplemento en el cultivo del hongo
Pleurotus ostreatus”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

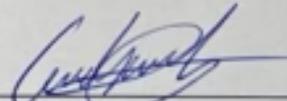
PRESENTA:

Javier Armenta Cortez

Aprobada por:



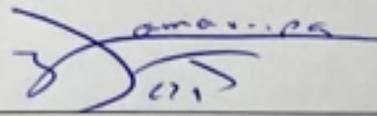
Dra. Haydee López Rodríguez
Director



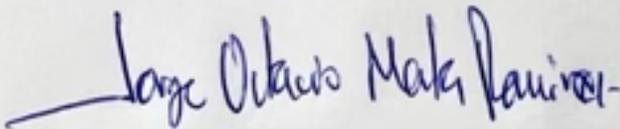
M.I. Guillermo Amaya Parra
Codirector



Dr. Ulises Jesús Tamayo Pérez
Sinodal



Dr. José de Jesús Zamarripa Topete
Sinodal



Dr. Jorge Octavio Mata Ramírez
Sinodal

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Nanotecnología	2
2.2. Síntesis de nanomateriales	3
2.3 Nanotecnología en la industria agroalimentaria	4
2.4 Nanoencapsulación y nanocargadores	10
2.5 Liposomas	12
2.5.1 Ventajas del uso de liposomas	14
2.6 Biología y fungicultura de Pleurotus ostreatus.	15
2.6.1 Nanotecnología en la fungicultura	19
2.6.2 Situación actual de la industria de la fungicultura	19
3. Justificación	22
4. Objetivos	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos	24
5. Hipótesis	24
6. Metodología	25
6.1 Síntesis de liposomas	25
6.2 Caracterización de liposomas	26
6.3 Aplicación de liposomas cargados con NH₄NO₃ a cultivos de P. ostreatus	27
6.5 Análisis estadístico	28
7. Resultados	29
7.1 Caracterización de liposomas	29
7.2 Carrera de micelio	30
8. Discusión	34
8.1 Efecto de la aplicación de NH₄NO₃ en el desarrollo de micelio	34
9. Conclusiones	36
10. Bibliografía	37

Índice de figuras

1. Diagrama de sistemas atómico, molecular y supramolecular	3
2. Categorías de nano fertilizantes	6
3. Comparación de patentes nano-relacionadas con aplicaciones en sectores específicos de la industria	7
4. Desarrollo temporal de publicaciones referentes a nanomateriales en la agricultura	8
5. Aplicaciones de nanomateriales en la agricultura	9
6. Nanoestructuras utilizadas como nanocargadores	10
7. Vista transversal de un liposomas, una micela y una bicapa lipídica	11
8. Modificaciones de membrana utilizadas para dirigir liposomas	13
9. <i>P. ostreatus</i> silvestre	14
10. Ciclo de vida de <i>P. ostreatus</i>	15
11. Cultivo de hongos en botellas de polipropileno	16
12. Diagrama de metodología de síntesis de liposomas	22
13. Curvas de crecimiento de micelio en cada tratamiento	25
14. Gráfico de barras del desarrollo de micelio en mm/día	26
15. Carrera de micelio al día 12	27

Índice de tablas

1. Descripción de tratamientos	23
2. Características de los liposomas usados por tratamiento	25
3. Resumen de ANOVA	26
4. Crecimiento de micelio por día de cada réplica	27

1. Resumen

Con el crecimiento de la población mundial, aumenta la necesidad por el desarrollo de tecnologías agrícolas eficientes que satisfagan la demanda global de alimentos con el mínimo impacto ambiental posible. En medicina, la liberación de fármacos a la nanoescala ha ofrecido una mejora en la precisión terapéutica mediante la focalización a tejidos enfermos. En este proyecto se sintetizó un sistema de liberación de fertilizante nanoencapsulado y se aplicó al sustrato utilizado en el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Se demostró que la encapsulación en liposomas mejora el desarrollo de micelio y se obtiene un mayor rendimiento en la producción de cuerpos fructíferos, probablemente por la mejora en el aprovechamiento del nitrógeno del sustrato.

Las caracterizaciones realizadas a los liposomas fueron dispersión de luz dinámica (DLS) para conocer su tamaño y potencial Z, además de una prueba con azul de metileno para medir encapsulamiento mediante espectroscopia UV-Vis.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, nanofertilizantes, liposomas, nanofertilizantes, nanotecnología en agricultura.

2. Introducción

2.1. Nanotecnología

Durante el último par de décadas se ha vivido una nueva revolución en la ciencia, el modelo “nano”, representado por dos disciplinas denominadas ciencia y tecnología. Estas se basan en el desarrollo de métodos de fabricación precisos, reproducibles, y de bajo costo para la obtención de estructuras cada vez más pequeñas. La definición más corta y citada de nanotecnología es una declaración del US National Science and Technology Council (NSTC) que expone: *“La esencia de la nanotecnología es la habilidad de trabajar a nivel molecular, átomo por átomo, para crear grandes estructuras con una nueva organización molecular fundamental. Con el objetivo de explotar sus propiedades mediante el control de estructuras y dispositivos a niveles atómicos, moleculares, y supramoleculares así como aprender a manufacturarlos y utilizarlos de manera eficiente”* [1]. La premisa de la nanotecnología se basa en el hecho de que los materiales a la nanoescala poseen propiedades (ej. mecánicas, ópticas, químicas y eléctricas) diferentes a las de los materiales en la macroescala. Algunas de estas propiedades son de alguna manera intermedios entre aquellas de los elementos más pequeños que lo constituyen (átomos y moléculas) y aquellas de su forma macroscópica

Figura 1.

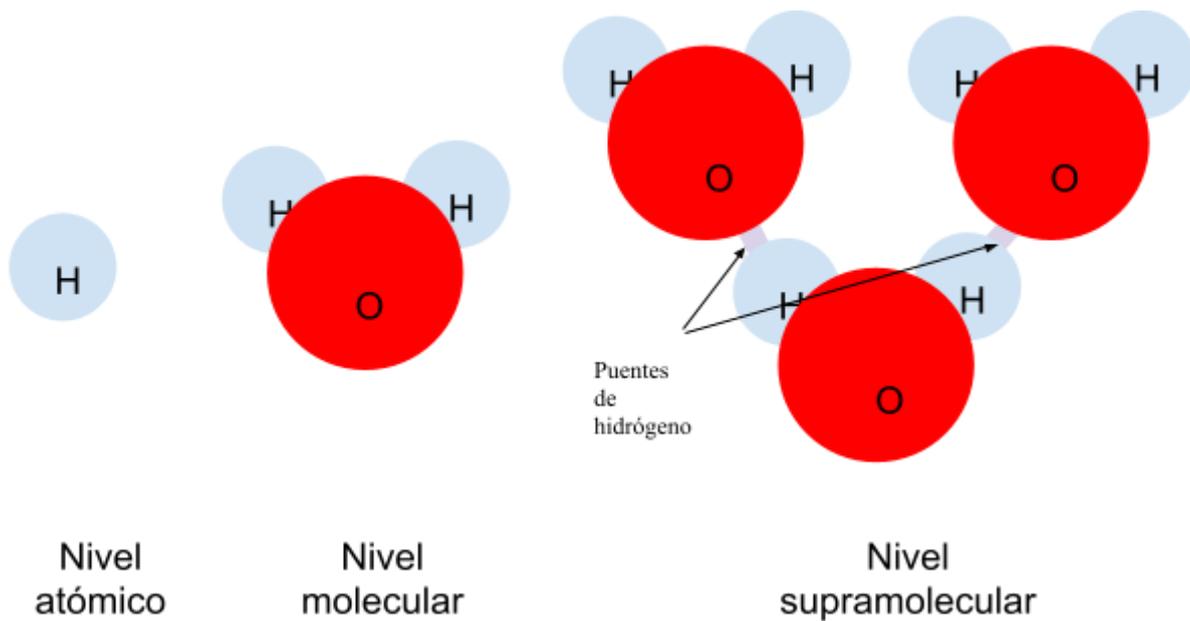


Figura 1. Diagramas de un sistema atómico, molecular y supramolecular de moléculas de agua.
 (Elaboración propia con base en [2])

Esta premisa ha permitido que la nanotecnología sea aplicada en gran variedad de áreas de estudio con la intención de potenciar las características de diversos materiales o permitir la implementación de algunos nuevos, entre los más conocidos se encuentran el área médica, de catalizadores, electrónica, energías renovables y biotecnología [2]. Enfocándonos en esta última, la aplicación de la nanotecnología en la biotecnología da lugar a la bionanotecnología donde se engloban todas las interacciones de los nanomateriales con organismos vivos y se han obtenido grandes avances para la industria agroalimentaria.

2.2. Síntesis de nanomateriales

La síntesis de nanomateriales (NM) puede ser clasificada de manera sencilla según dos aproximaciones:

1. Aproximación top down
2. Aproximación bottom up

La aproximación de arriba a abajo (Top down) consiste en la reducción del tamaño de un material en bulto principalmente mediante métodos físicos hasta llegar a la nanoescala, esto incluye la molienda, pulverización, ablación, evaporación-condensación etc [1]. Mientras que la aproximación de abajo a arriba (Bottom up) engloba los métodos principalmente químicos en los que los NM se forman mediante el auto-ensamblaje de sus componentes elementales (átomos y moléculas). El ensamblaje de estos está gobernado por el balance de fuerzas atractivas entre las moléculas (como enlaces covalentes, puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas) [3]. La organización en nanopartículas genera gran variedad de estructuras que pueden ser modificadas durante la síntesis mediante el control de factores como tiempos y temperaturas de reacción.

Ambas aproximaciones son ampliamente utilizadas, sin embargo, los métodos de arriba a abajo tienden a ser preferidos por la industria debido a su capacidad de escalamiento, además que tienden a requerir equipo menos especializado y un menor consumo energético [3,4].

2.3 Nanotecnología en la industria agroalimentaria

La búsqueda de nuevas técnicas para la producción y preservación de alimentos por parte del humano se remonta a tiempos antiguos. El desarrollo de la refrigeración, técnicas de secado y fermentación van de la mano con el desarrollo de tecnologías agrícolas como la hidroponía o el riego por goteo, los cuales han revolucionado la forma en que los humanos nos alimentamos. Hoy en día la nanotecnología es un área de interés emergente para esta industria ya que abre un nuevo mundo de posibilidades en áreas como el empaquetado y preservación, la incorporación de componentes activos con liberación controlada y el sensado y señalización de información relevante [5].

A pesar de que el uso consciente de nanoestructuras es algo reciente, la presencia de nanoestructuras auto-ensambladas en nuestros alimentos no es nada nuevo, de hecho, algunos de los materiales más importantes en los alimentos (proteínas, almidones y grasas) atraviesan cambios estructurales a la micro y nano escala durante su procesamiento convencional. La formación espontánea de estructuras como fibrilos, micelas, dextrinas etc. se da continuamente en la industria alimentaria, por ejemplo, la industria láctea se basa en el manejo de 3 micro y nanoestructuras principalmente (micelas de caseína, glóbulos grasos, proteínas de leche) para la elaboración de productos que vistos de otra manera pueden ser considerados nanocompositos, por ejemplo, la leche pasteurizada es un líquido complejo que incluye micro y nano micelas de caseína dispersas de forma estable, o el yogurt que obtiene su textura a partir de redes gelificadas de micro y nano fibras de polisacáridos [6].

El término “Nanofoods” o nanoalimentos en español, fue acuñado para referirse a todos aquellos alimentos que son producidos, procesados o empaquetados utilizando técnicas o herramientas nanotecnológicas. Los beneficios de los nanoalimentos incluyen mayor producción, prolongación de la vida de anaquel, la inclusión de aditivos promotores de salud etc.

La corta vida de anaquel de los alimentos es uno de los retos más grandes para alcanzar la seguridad alimentaria además de ocasionar grandes pérdidas económicas para la industria, la aplicación de recubrimientos antimicrobianos a alimentos de alto valor comercial es una de las formas en que los nanofoods ayudan a estas problemáticas. Un ejemplo de un producto de alto valor comercial que se puede ver beneficiado por la aplicación de estos recubrimientos es el arándano, en 2016 se reportó la implementación de recubrimientos con liposomas cargados de D-limonene en frutos cosechados con resultados positivos al inhibir el crecimiento de

hongos del género *Botrytis sp.* y *Penicillium sp.* así como de las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* [7].

Con un objetivo similar, se ha reportado la inhibición de crecimiento de hongos del género *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, y *Penicillium sp.* al agregar liposomas cargados con extracto de ajo a la masa de pan de trigo [8]. Los resultados presentados por la Universidad de Rio Grande do Sul demuestran que el encapsulamiento del extracto de ajo ayuda a mantener su actividad antifúngica de manera prolongada tanto in-vitro como in-situ [8].

Sin embargo, la aplicación de la nanotecnología no se limita a la preservación de alimentos, en la última década se han evaluado también los efectos de la implementación de nanoestructuras en la producción agrícola principalmente en forma de fertilizantes para los cuales se acuñó el término de nanofertilizantes [9], estos engloban a todas las sustancias aplicadas a los cultivos con la finalidad de mejorar su producción que incluyan una nanoestructura y se pueden clasificar en tres categorías como lo indica la figura 2.

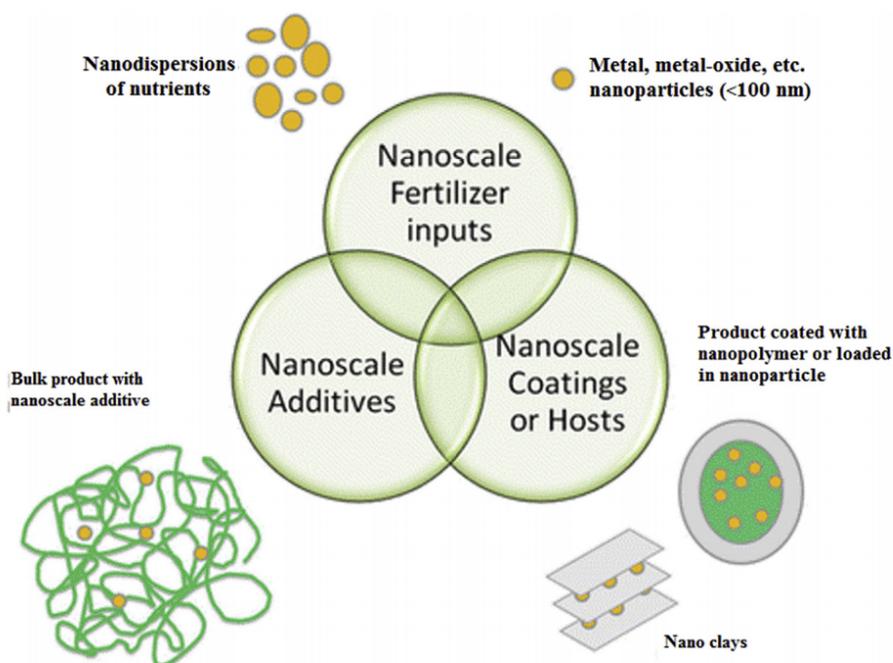


Figura 2. Categorías de nanofertilizantes [10].

En la primer categoría están los nano fertilizantes en los cuales el ingrediente activo es una nanoestructura, por ejemplo, la nanourea o las nanoemulsiones nutritivas [11,12]; en la segunda categoría se encuentran los sistemas anfitrión-huésped en los que el anfitrión es una nanoestructura y el ingrediente activo es el huésped sin necesidad de ser una nanoestructura, por ejemplo, nanoarcillas, nanocápsulas poliméricas, liposomas, etc.[13,14]; mientras que en la tercer y última categoría se encuentran los compositos en los que las nanoestructuras funcionan como aditivos a una matriz de ingrediente activo fuera de la nanoescala por ejemplo, mezclas de sustrato con nanozeolita, nanocompositos poliméricos, etc. [15, 16].

Hoy en día ya es posible encontrar agroquímicos nanoestructurados, según la base de datos de productos nanotecnológicos (NPD) al 2020 existen 75 compañías enfocadas en el lanzamiento de productos verificados como nanoestructurados para la agroindustria con un total de 231 productos en el mercado internacional de los cuales 110 se clasifican como fertilizantes o mejoradores de suelo [17]. Estos números son bajos en comparación con los de otras industrias que han sido tomadas como prioridad por investigadores como lo son la industria electrónica con 1925 productos verificados o la médica con 1081[18]. En términos de patentes a nivel global esta tendencia continúa con las industrias médica, electrónica y de materiales poseyendo el 84.6% de las patentes nano-relacionadas a nivel mundial como lo muestra la figura 3.

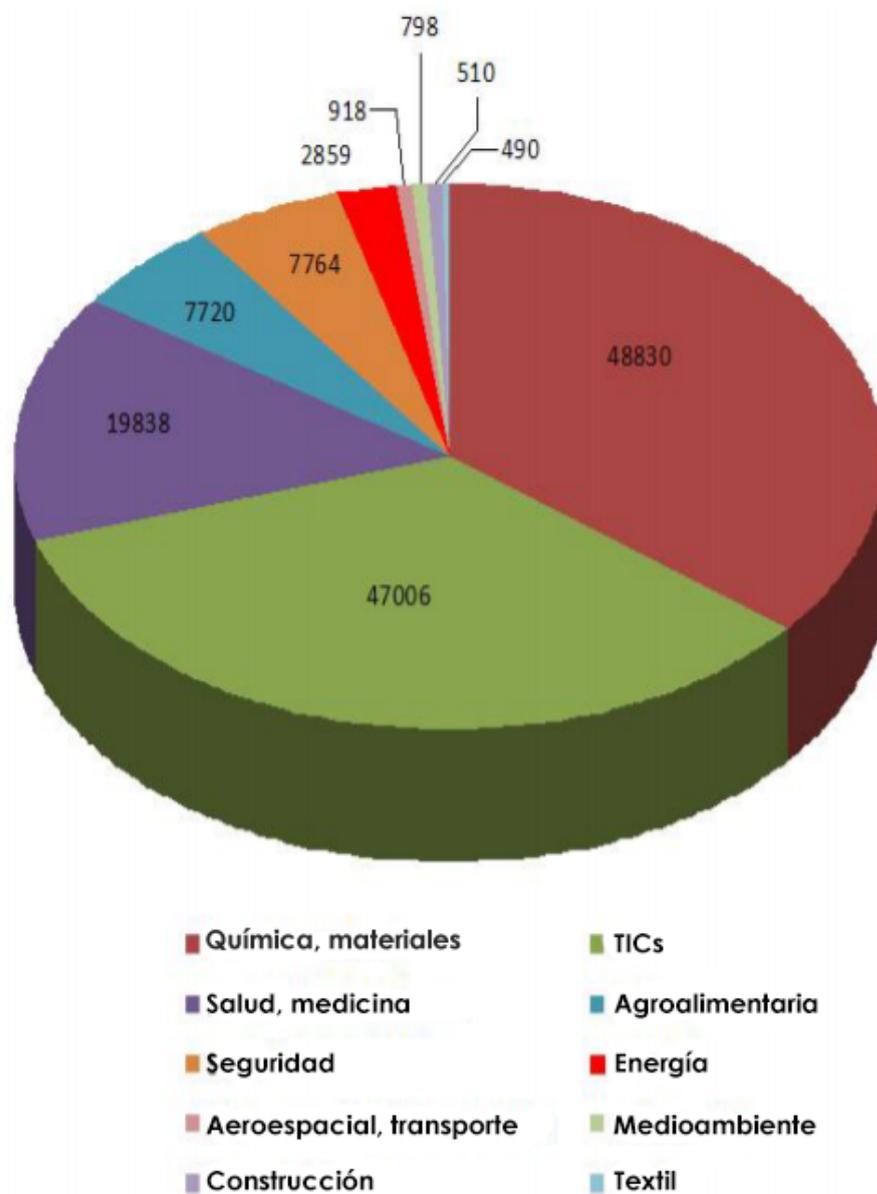


Figura 3. Comparación de patentes nano-relacionadas con aplicaciones en sectores específicos de la industria [19].

Sin embargo, esto no quiere decir que no exista un interés por el desarrollo de nanotecnologías con aplicaciones agroalimentarias, ya que durante las últimas dos décadas la búsqueda de información que relaciona a la nanotecnología con la agricultura ha aumentado de forma exponencial como se muestra en la figura 4.

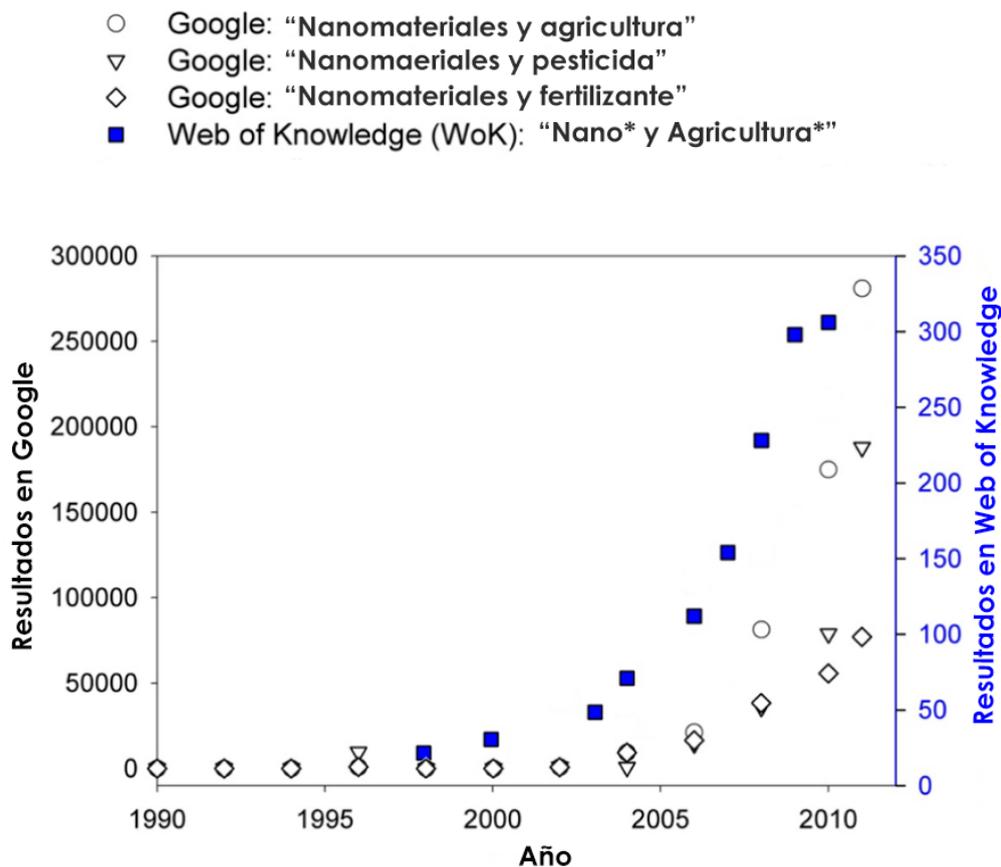


Figura 4. Desarrollo temporal de publicaciones referentes a NM en agricultura desde 1990: como búsqueda general en Web of Knowledge (WoK, eje derecho, cuadros azules), como búsquedas en google (eje izquierdo, símbolos vacíos). Las búsquedas fueron realizadas en noviembre de 2011, [20].

Dentro de las investigaciones que relacionan a la nanotecnología con la agricultura se puede ver una tendencia hacia el desarrollo de productos de protección de plantas (PPP), con el 74% de todos los artículos publicados al 2011 orientados al desarrollo de PPP (Figura 5), esto coincide con las investigaciones sobre las actividades antibióticas de múltiples nanopartículas sobre todo metálicas que explotaron a mediados de la década de los 2000s con la US National Nanotechnology Initiative (US NNI) [21].

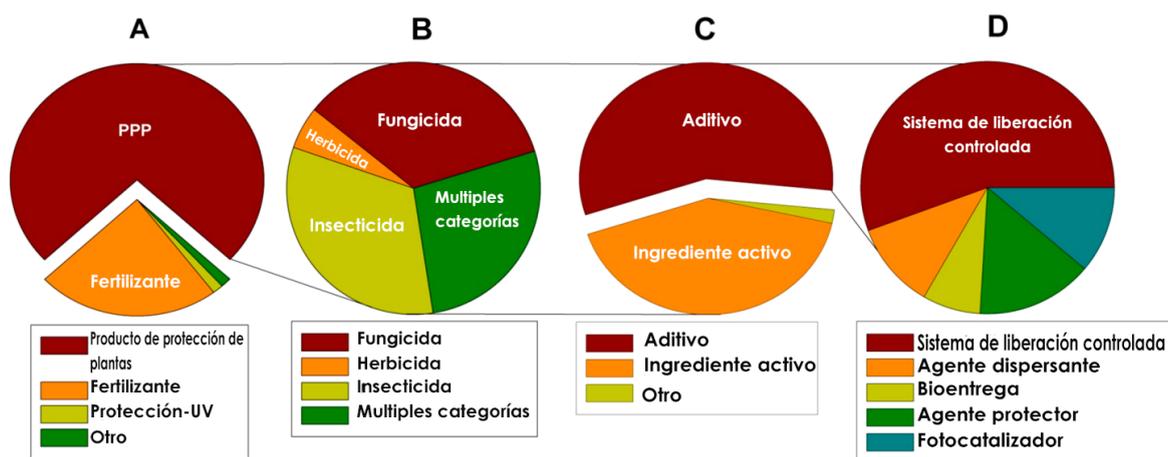


Figura 5. Aplicaciones de NM en agricultura (A), Tipos de PPP que contienen NM (B), Funciones generales de los NM en PPP(C), Funcionamiento de los NM como aditivos de PPP(D)[20].

En el caso de productos mexicanos solo existen actualmente 2 productos verificados por la NPD como agroquímicos nanoestructurados siendo ambos nanofertilizantes de la categoría 1, sin embargo, en el mercado también se encuentran nanoproductos mexicanos aún sin la verificación de la NPD como **CopperKelp®** de la empresa **Algas Pacific®** el cual es un PPP utilizado para el control de fitopatógenos y se clasifica también en la categoría 1 utilizando nanopartículas de cobre como ingrediente activo [22]. Para ponernos en perspectiva, el sistema desarrollado en esta tesis sería un nanofertilizante de liberación controlada que clasificaría en la categoría 2.

2.4 Nanoencapsulación y nanocargadores

Los nanocargadores generalmente son definidos como objetos con al menos alguna de sus dimensiones en la escala de 1-100 nanómetros (aunque algunos autores incluyen dimensiones menores a 500 nm en la nanoescala), capaces de retener compuestos para liberarlos bajo ciertas condiciones, encargándose de la cinética de transporte y liberación en lugar del

ingrediente activo que portan [23]. Dichas condiciones dependen de las características del cargador mismo, es decir tamaño, forma, composición química, carga, etc.

El desarrollo de las tecnologías de nanoencapsulación surge como una alternativa a la entrega de compuestos bioactivos a células y tejidos con el objetivo de prevenir efectos adversos que la metabolización de estos compuestos puede causar al ser ingeridos en concentraciones operativas [24]. Los NM utilizados como cargadores están diseñados para entregar dichos compuestos a un tejido objetivo y aumentar su bioeficacia, incluyendo agentes como nanopartículas, dendrímeros y cargadores a base de polímeros o lípidos como es el caso de los liposomas Figura 6.

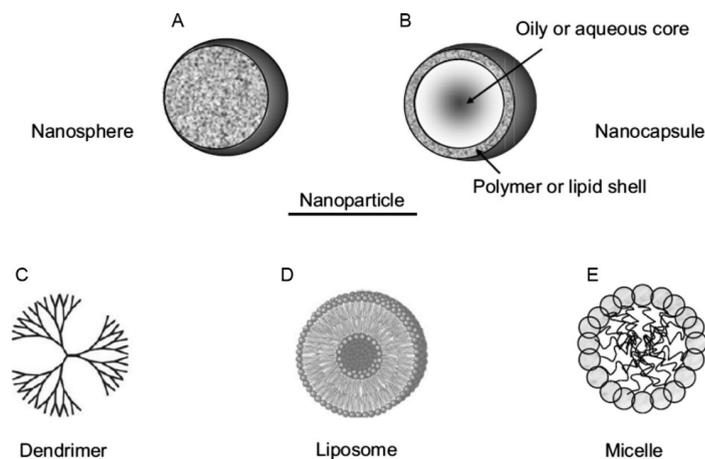


Figura 6. Nanoestructuras utilizadas como nanocargadores[23]

Debido a su pequeño tamaño, los nanocargadores poseen una alta relación de superficie-volumen proveyendo una amplia área superficial para el decorado con partículas que le dotan de especificidad a tejidos, así como de un volumen interno capaz de encapsular compuestos de interés, comúnmente fármacos o marcadores biológicos [23].

Para el caso de la mayoría de las nanocápsulas incluyendo a los liposomas, el incremento del volumen interno se da de manera cúbica con el aumento del tamaño, mientras que la superficie aumenta de manera cuadrática, sin embargo, para los nanocargadores no esféricos esta relación no se cumple. Por ejemplo, en el caso de los cargadores filamentosos como los dendrímeros, el área superficial se ve mayormente impactada por el aumento en el radio que el volumen interno [24].

El mayor impacto de los nanocargadores ha sido en el área médica donde funcionan como transportadores de fármacos o diversos bioactivos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, sin embargo, las investigaciones con respecto a los nanocargadores han aumentado de manera exponencial en los últimos años, según la base de datos de Science Direct, en 2010 se realizaron 271 publicaciones sobre nanocargadores en las áreas de farmacología y medicina, mientras que en el área de agricultura y ciencias biológicas solo 10, para el año 2020 las publicaciones en ambas áreas aumentaron considerablemente, llegando a 1481 y 314 respectivamente [25].

2.5 Liposomas

Los liposomas son nanoestructuras esféricas huecas formadas por una bicapa lipídica como lo muestra la Figura. 7. Están formados por fosfolípidos autoensamblados por su naturaleza anfifílica, lo cual les otorga una gran variedad de características dependiendo de la mezcla lipídica que los conforme. Dichas estructuras han sido ampliamente estudiadas gracias a su capacidad de cargar soluciones acuosas en el interior y moléculas hidrofóbicas embebidas en la bicapa lipídica; esta estructura los hace compatibles con los sistemas biológicos [26]. Estas características han hecho de los liposomas un nanocargador de gran interés para la industria farmacéutica y cosmética [27].

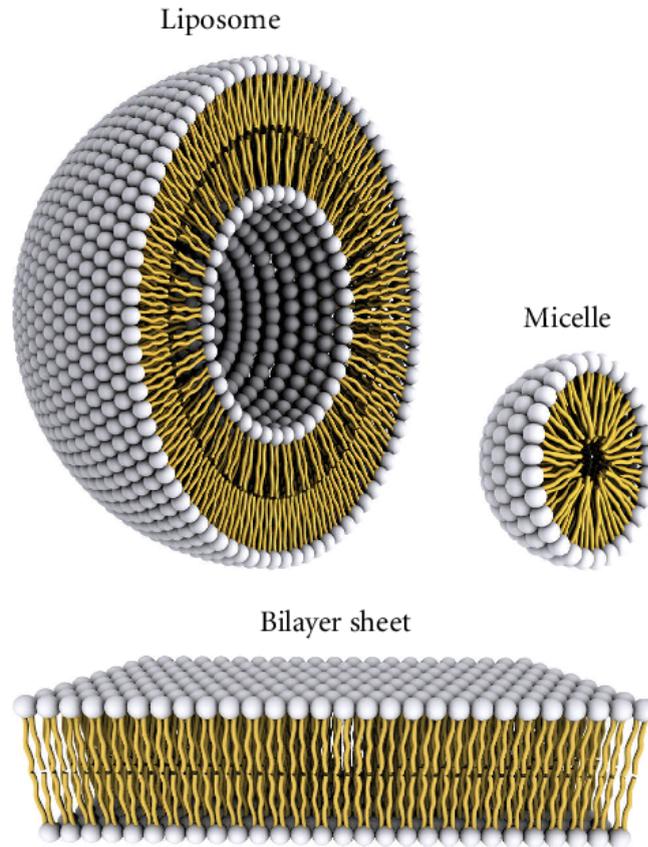


Figura 7. Vista transversal de un liposoma, una micela y una bicapa lipídica.[28]

Para clasificar a los liposomas se toma en cuenta principalmente su tamaño y número de bicapas, para el caso de liposomas unilamelares se dividen en pequeños con un tamaño de 15-100nm (SUV) medianos 100-500nm (MUV), grandes 500-100 nm (LUV) y gigantes con un tamaño mayor a una micra (GUV). Hoy en día los LUVs son los favoritos por la industria farmacéutica y alimentaria, aunque no son considerados nanoliposomas, mientras que los GUVs son principalmente utilizados como modelos para estudios físicos y químicos sobre la membrana celular [16].

2.5.1 Ventajas del uso de liposomas

Los liposomas presentan múltiples ventajas en comparación con la aplicación de bioactivos libres, como una mejoría en la estabilidad fisicoquímica de los compuestos encapsulados,

mejora la dispersabilidad en agua y no suelen influir de manera significativa en la efectividad biológica de los compuestos. Por el contrario, se ha considerado a los costos de producción como la mayor desventaja para su uso potencial [29].

La mejora de la estabilidad fisicoquímica resulta de especial importancia cuando se trata de encapsular compuestos reactivos o inestables que pueden sufrir alteraciones al encontrarse libres como en el caso de péptidos utilizados de manera terapéutica sensibles a cambios de pH o capaces de quelar micronutrientes como es el caso de la nisina [30].

La otra característica que le ha dado su lugar en el mercado a los liposomas es su potencial selectividad a tejidos específicos, esta especificidad puede ser otorgada de dos formas, la focalización pasiva que se basa en la respuesta natural del cuerpo a las características fisicoquímicas del liposoma (fluidez, carga, pH isoelectrico, etc.) y la focalización activa, en la cual los liposomas son conjugados con agentes que inducen la absorción de estos mediante algún tipo de señalización (ligandos, aptámeros, anticuerpos, etc.) (Figura 8) [31].

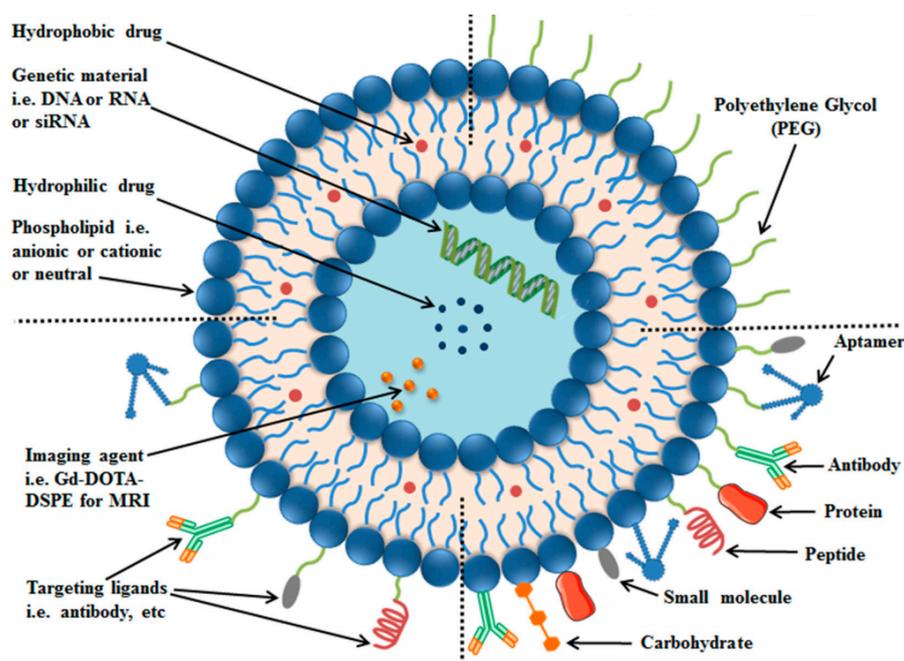


Figura 8. Modificaciones de membrana utilizadas para dirigir liposomas [32].

2.6 Biología y fungicultura de *Pleurotus ostreatus*.

El género *Pleurotus* abarca 40 especies de hongos a los que se le refiere comúnmente como “hongo ostra” y se esparcen ampliamente a través de zonas tropicales y subtropicales, son cultivados de manera artificial con relativa facilidad, lo que los ha hecho populares en el mercado. Tanto el nombre común como el científico del hongo hacen referencia a la forma de su cuerpo fructífero el Latin *Pleurotus* (oblicuo) se refiere al crecimiento que tiene sombrero con respecto al tallo, mientras que el Latin *Ostreatus* (ostra) de igual manera que el nombre común, hacen referencia a la forma del sombrero (Figura 9) [33].



Figura 9. *P. ostreatus* silvestre [34].

En la naturaleza, los hongos de este género suelen crecer en materiales de desecho y colonizar materia orgánica muerta, principalmente madera, son organismos saprófitos que funcionan como descomponedores primarios convirtiendo tejido orgánico muerto en los nutrientes necesarios para su desarrollo, su micelio secreta enzimas digestivas que rompen reducen ligno-celulosa en partículas más pequeñas y a su vez dirige nutrientes al suelo [35, 36].

Durante su ciclo de vida, el hongo ostra atraviesa las fases vegetativa y reproductiva. Durante la fase vegetativa el micelio crece mediante la generación de hifas que se extienden a través del sustrato como una red; el desarrollo correcto del micelio juega un papel fundamental en la síntesis de nutrientes a partir del sustrato y para la formación exitosa de cuerpos fructíferos, durante la colonización tardía del sustrato para dar inicio a la fase reproductiva, el micelio atraviesa una etapa de plasmogamia, en la cual las hifas se empiezan a fusionar en pares formando células con un par de núcleos haploides que bajo las condiciones correctas dan lugar el estado conocido como cariogamia, en el cual dichos núcleos apareados se fusionan y someten a meiosis para la producción de los basidios diploides que son las células sexuales de los hongos [37].

El cuerpo fructífero está conformado por micelio diferenciado y dichos basidios ubicados en las agallas debajo del sombrero y la fase reproductiva culmina con la liberación de esporas (basidiosporas) producidas en los basidios las cuales son acarreadas por el viento y otros organismos para encontrar otro sustrato viable en el cual germinar y comenzar el ciclo de nuevo (Figura 10) [34,37].

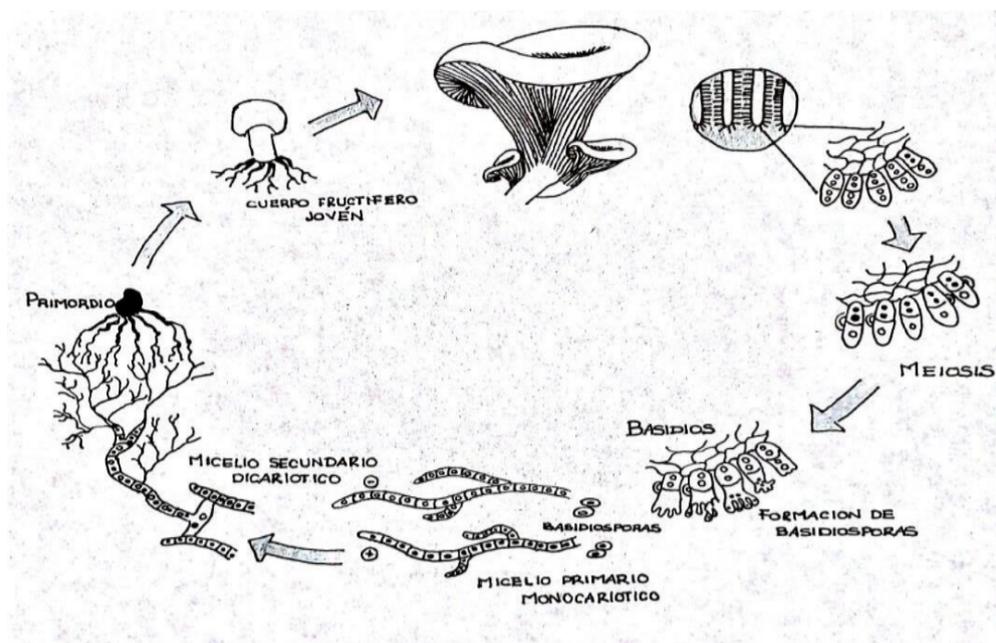


Figura 10. Diagrama del ciclo de vida de *P. ostreatus*. [38].

Además de su valor comercial, el cultivo de *P.ostreatus* y en general de los hongos comestibles es considerado un proceso biotecnológico, por el reciclaje de materia orgánica y es considerado hoy en día como el único proceso que combina la producción de alimento rico en proteína con la reducción de contaminación ambiental, dando como resultado fuentes de alimento con un valor nutricional comparable a aquel del huevo, la leche y la carne [39].

Para su cultivo artificial se implementan distintas técnicas que pueden variar de contenedor, sustrato o tipo de inóculo. Los contenedores más utilizados son las bolsas de plástico y botellas de polipropileno que varían en tamaño según el propósito del cultivo (Figura 11)[40].



Figura 11. Fotografías de diferentes tamaños y formas de botellas de polipropileno utilizadas en el cultivo de hongos (a) y producción de *P.ostreatus* en botellas de polipropileno [40].

Aunque existen diversos métodos para la producción de hongos todos siguen a grandes rasgos el mismo proceso. Primero se prepara el sustrato, para el caso de la producción de hongos ostra se utiliza comúnmente aserrín o paja de trigo el cual se mezcla con aditivos para mejorar la producción, posteriormente el sustrato es esterilizado o en su defecto pasteurizado para evitar el crecimiento de otros organismos, la forma más utilizada a nivel industrial es la

esterilización por autoclave a 120°C y 15-25 psi con el tiempo variando entre 20 y 90 min dependiendo de la cantidad de sustrato [35].

Una vez se enfría el sustrato este se inocula con granos previamente colonizados o un cultivo en líquido del hongo y se incuba hasta que el sustrato se encuentre completamente colonizado, por último es necesario promover el inicio de la fase vegetativa del hongo cambiando sus condiciones ambientales para que se desarrolle el cuerpo fructífero y este sea cosechado [40].

2.6.1 Nanotecnología en la fungicultura

Aunque la fungicultura es una industria que ha visto un crecimiento importante en las últimas décadas y la implementación de aditivos a los sustratos está ampliamente reportado, los reportes que se tenían sobre la aplicación de la nanotecnología para la producción de hongos al momento de comenzar este proyecto eran nulos.

La relación que mantenían los hongos comestibles con la nanotecnología es la propiedad que poseen algunos para sintetizar nanopartículas mediante la reducción de iones metálicos [40], sin embargo, la aplicación de nanomateriales como aditivos en la producción de hongos comestibles no había sido reportada hasta marzo del 2020 con las investigaciones de L.Naim et. al sobre el uso de nanofertilizantes comerciales de la línea **Lithovit** ®[41,42] en los que se evalúan los efectos de diferentes dosis de los nanofertilizantes comerciales a base de nanourea y aminoácidos en la calidad y producción de *P. ostreatus* como producto de relevancia económica. De estas investigaciones cabe destacar que se reportan beneficios tanto en la producción del hongo como en el aprovechamiento económico, sector en el cual

remarcan es necesario hacer pruebas con menores dosis de nanofertilizante así como pruebas de producción a nivel comercial para validar el uso de este nanofertilizante en la fungicultura [42,43].

2.6.2 Situación actual de la industria de la fungicultura

Actualmente, la población mundial ha diversificado su dieta en búsqueda de alimentos más amigables con el ambiente, esto ha aumentado el consumo de hongos a nivel mundial haciéndolos un producto de importancia económica en México y otros países. En los últimos veinte años, la producción de hongos comestibles en México ha tenido un crecimiento significativo. Durante el periodo de 1991 a 2011, la producción pasó de 9 mil 036 a 62 mil 374 toneladas de hongos frescos por año, se ha sextuplicado el volumen de producción en el país. Por lo cual, México se posicionó como el mayor productor de hongos comestibles de Latinoamérica, al generar el 80.8% de la producción para la región, seguido por Brasil (7.7%) y Colombia (5.2%). A nivel mundial México se ubica en el décimo tercer lugar de los países productores de hongos comestibles [44].

En el 2018, el mercado global de hongos frescos alcanzó un valor de 38 billones de dólares con los hongos ostra representando el 16% de la producción global posicionando al género *Pleurotus spp.* como el segundo de mayor relevancia económica en la industria de hongos comestibles [45].

Los hongos ostra son cultivados masivamente en sólido como fuente de alimento o en medio líquido para la obtención de gran variedad de metabolitos bioactivos. [46] Algunas de las características que favorecen el cultivo de los hongos de este género es su habilidad para desarrollarse en diversas condiciones ambientales, habilidad para crecer en una amplia gama de biomásas lignocelulósicas y la relativa sencillez de su cultivo. Sin embargo, como en el

caso de otros hongos, la baja tasa de crecimiento es uno de los principales problemas afectando los costos de producción. Es por eso que el desarrollo de aditivos que aumenten la tasa de crecimiento cobra importancia [47].

Aunque existe una gran variedad de mezclas de sustrato y aditivos disponibles, la accesibilidad y consistencia de los aditivos inorgánicos como el nitrato de amonio y la urea los mantienen entre los favoritos de los productores. La suplementación de nitrógeno se convierte en una necesidad para tener una producción competitiva debido a que dicho elemento es indispensable para las rutas de síntesis de nucleótidos, aminoácidos y otros compuestos importantes para las células. Con el uso de estos aditivos se han documentado mejoras de hasta un 50% en el desarrollo del micelio ajustando los niveles de nitrógeno en el sustrato [48]. Sin embargo, el uso de estos fertilizantes nitrogenados tiene una desventaja, para el caso de el NH_4NO_3 una vez este es aplicado se disocia y los organismos absorben los nitratos, pero una parte importante de nitrógeno proveniente del amonio se volatiliza [49].

3. Justificación

Con el rápido crecimiento de la industria de hongos alimenticios cada vez se vuelve más relevante el desarrollo de tecnologías que satisfagan las necesidades de los productores, en el caso del cultivo del hongo *P. ostreatus* una de las áreas de oportunidad se encuentra en el desarrollo de suplementos para sustrato, esto ya que los sustratos más comúnmente utilizados son pobres en nitrógeno, componente vital para el crecimiento eficiente del hongo al ser indispensable para la síntesis de compuestos orgánicos. Para contrarrestar este problema, es común la adición de fertilizantes ricos en nitrógeno como al nitrato de amonio al sustrato el cual al disolverse en el agua utilizada para humedecer el sustrato se disocia y mientras el amonio es rápidamente aprovechado por el hongo, sin embargo, una parte importante se pierde en forma de nitrato debido a su volatilidad y su lenta asimilación en comparación con el amonio.

Con la finalidad de resolver la problemática de la volatilización de nitrógeno podemos recurrir a la nanotecnología, ya que un área importante en la cual se ha visto involucrada en años recientes es la agricultura, en particular, en la creación o modificación de fertilizantes. Un ejemplo de esto, son los nano-fertilizantes de urea que han sido utilizados en varios cultivos de plantas ofreciendo ventajas comparadas con los fertilizantes tradicionales y siendo más amigables con el medio ambiente. Dentro de las ventajas que ofrecen los nano-fertilizantes encontramos la liberación regulada del compuesto activo, controlando de forma eficiente las concentraciones finales de fertilizante y permitiendo el uso de menores concentraciones. El uso de fertilizantes generados con nanotecnología ha sido poco estudiado en hongos a diferencia de las plantas y en particular en *P. ostreatus* solo existe un reporte reciente [42].

Con el objetivo de que se aproveche la mayor cantidad de nitrógeno y evitar su volatilización, en este trabajo se pretende nanoencapsular el nitrato de amonio en liposomas. Estos liposomas cargados con el fertilizante serán utilizados en cultivos de *P. ostreatus* y se analizará su efecto en el crecimiento de este hongo.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Analizar la efectividad del nitrato de amonio (NH_4NO_3) nanoencapsulado en liposomas como suplemento en el hongo *P. ostreatus*.

4.2. Objetivos específicos

- Encapsular el NH_4NO_3 en liposomas.
- Suspender liposomas cargados con NH_4NO_3 en el agua utilizada para humedecer el sustrato en cultivos del hongo *P. ostreatus*.
- Analizar el efecto de los liposomas cargados con NH_4NO_3 en el crecimiento de *P. ostreatus*.

5. Hipótesis

La aplicación de liposomas cargados con nitrato de amonio (NH_4NO_3) en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* mejorará el aprovechamiento del nitrógeno, lo cual se verá reflejado en el crecimiento del hongo.

6. Metodología

6.1 Síntesis de liposomas

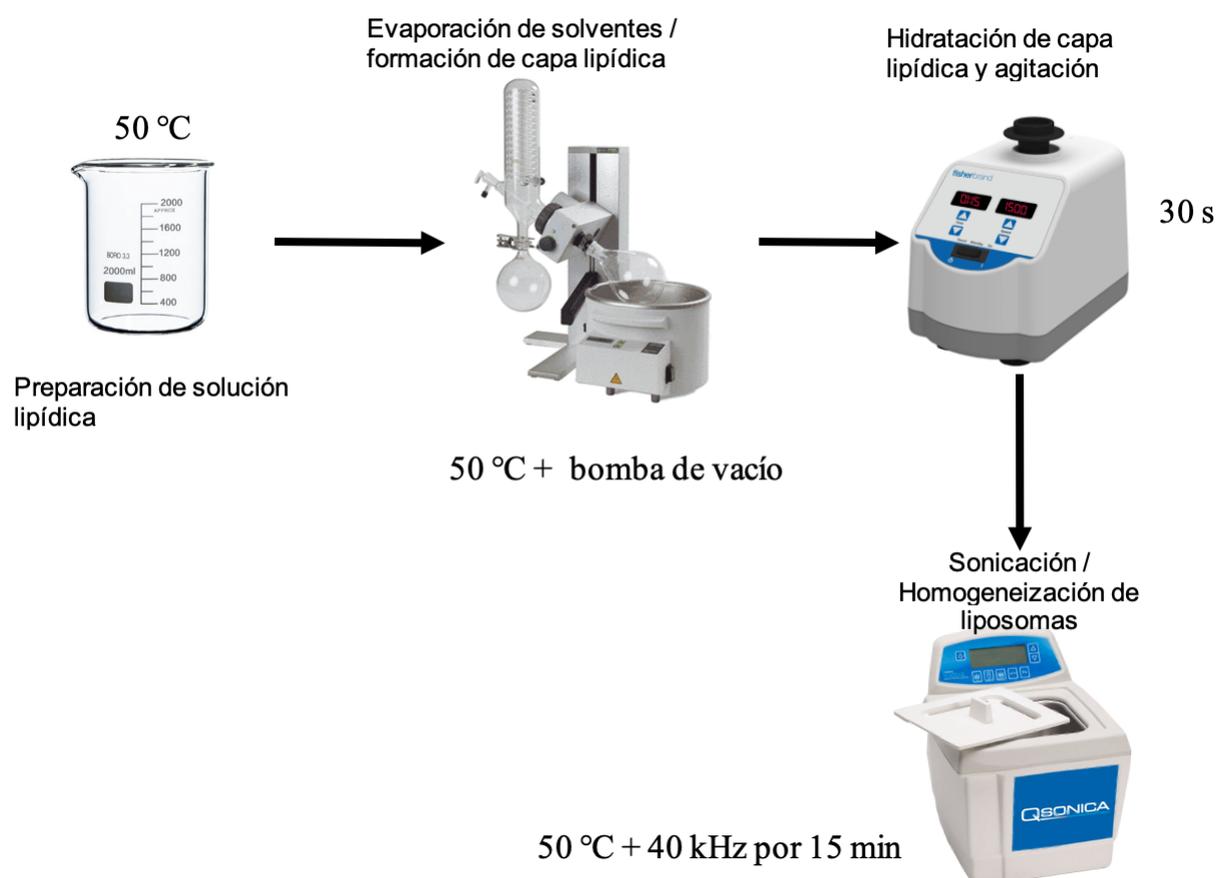


Figura 12. Diagrama de metodología de síntesis de liposomas

La síntesis de liposomas se llevó a cabo mediante hidratación de capa lipídica (Lipid Film Hydration) seguida de sonicación como lo describe Pinilla C. [8] con algunas modificaciones. Se agregaron lecitina de soya (Food technology tradings) y ácido oleico (Sigma Aldrich) en un radio molar 1:1 a una mezcla de 10 mL de metanol-cloroformo (Sigma Aldrich) 1:2 v/v a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo en agitación constante hasta obtener una mezcla homogénea. Los solventes fueron removidos mediante evaporador rotatorio asistido de bomba de vacío hasta

obtener una capa delgada de lípidos seca en las paredes del matraz, importante asegurarse de obtener una capa seca para evitar residuos de los solventes.

La recuperación de la capa lipídica se llevó a cabo añadiendo 60 ml de la solución tratamiento correspondiente a 50 °C, agitando en vórtex por 30s y sometiendo a baño ultrasónico 40 kHz por 15 min a 50 °C. Las soluciones tratamiento encapsuladas fueron 4 soluciones acuosas de NH₄NO₃ al 0%, 0.25%, 0.75% y 1.25% m/v.

6.2 Caracterización de liposomas

El tamaño y potencial Z de los liposomas fue determinado mediante dispersión de luz dinámica (Zetasizer Z) como es descrito por Brandelli A. [50]

La eficiencia de encapsulamiento se obtuvo mediante espectroscopia UV-Vis mezclando las metodologías reportadas por Panwar et.al y J. Mater [51,52]. Para el análisis se encapsuló una solución de azul de metileno 0.1 M, posteriormente se separó la suspensión de liposomas mediante centrifugación a 20,000g por 1 hora a 4 °C, se tomaron alícuotas de 1 ml de sobrenadante y 1 ml de azul de metileno 0.1M, se les agregó 1 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 660 nm, utilizando la ley de Beer-Lambert (Fórmula 1) se determinó la cantidad de azul de metileno encapsulado.

$$C = A/\epsilon l$$

Fórmula 1. Ley de Beer-Lambert

Donde C es la concentración de azul de metileno, A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absorbancia ($7.15 \times 10^4 / mol\ cm$ para el azul de metileno) y l es la longitud de la solución (1cm). La eficiencia de encapsulamiento es expresada como porcentaje de atrapamiento y fue calculado a través de la Fórmula 2.

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento}\% = \frac{\text{Azul de metileno } 0.1M - \text{Azul de metileno en sobrenadante}}{\text{Azul de metileno } 0.1M} \times 100$$

Fórmula 2. Fórmula utilizada para calcular la eficiencia de encapsulamiento como porcentaje

6.3 Aplicación de liposomas cargados con NH_4NO_3 a cultivos de *P. ostreatus*

Para evaluar los efectos del encapsulamiento del NH_4NO_3 en el desarrollo del hongo se realizaron 6 cultivos de *P. ostreatus* con diferentes concentraciones de NH_4NO_3 encapsulado como aditivo como lo muestra la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de tratamientos C indica tratamientos control sin liposomas, L indica tratamientos con liposomas, indica la concentración de NH_4NO_3 aplicado.

Código de tratamiento	Método de fertilización	Concentración de NH_4NO_3
a) C 0.0%	Libre	0%
b) C 0.75%	Libre	0.75%
c) L 0.0%	Liposomas + agua	0%
d) L 0.25%	Liposomas + NH_4NO_3	0.25%
e) L 0.75%	Liposomas + NH_4NO_3	0.75%
f) L 1.25%	Liposomas + NH_4NO_3	1.25%

El crecimiento de *P. ostreatus* se evaluó mediante una carrera de micelio como lo describe Soto-Cruz [53]. En tubos de cultivo de 16mm x 150mm se agregaron 6 g de aserrín humedecido con 9 ml de agua destilada y esterilizaron en autoclave a 120°C, 20 psi por 1h posteriormente se agregaron 9 ml de solución tratamiento, inocularon e incubaron en oscuridad a 25° C.

Para inocular los tubos se utilizó un cuadro de 1cm x 1cm de un cultivo de 7 días de *P. ostreatus* en PDA, el crecimiento del micelio se midió cada 48 h con un vernier hasta que un tratamiento colonizara el tubo por completo.

6.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el complemento XL miner tool pack para microsoft excel y el software **Statgraphics 19**®, las pruebas realizadas fueron ANOVA de un factor y contraste múltiple de rango por el método de Duncan, con un nivel de confianza del 95%.

7. Resultados

7.1 Caracterización de liposomas

Por motivos de la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2 (Covid 19) no fue posible realizar el análisis de dispersión de luz dinámica a los liposomas utilizados en esta iteración del experimento, sin embargo, aquí se presentan los resultados obtenidos de una caracterización realizada a liposomas sintetizados bajo la misma metodología para una iteración del experimento realizada en marzo del 2020.

En la Tabla 2 se presentan las características de los liposomas utilizados como tratamiento, el índice de polidispersidad (PDI) indica la distribución de tamaño de los liposomas en la suspensión; el potencial Z indica la magnitud de la carga de repulsión entre liposomas que evita la formación de agregados y es uno de los parámetros fundamentales a considerar para identificar a una suspensión estable.

Tabla 2. Características (tamaño, PDI y potencial Z) de los liposomas usados en cada tratamiento.

Tratamiento	Diámetro medio	PDI	Potencial Z (mV)
L 0.0%	203 nm	0.481	-32.8
L 0.25%	176 nm	0.220	-43.1
L 0.75%	165 nm	0.292	-38.0
L 1.25%	188 nm	0.292	-46.4

El tratamiento L 0.75% es el que presentó menor tamaño con un diámetro medio de 165 nm, mientras que el tratamiento con mayor uniformidad de tamaño fue L 0.25% con un PDI de 0.22, por otro lado el tratamiento con mejor estabilidad fue L 1.25% con un potencial Z de -46.4 mV.

La prueba de encapsulación de azul de metileno dio como resultado un encapsulamiento del 34.6%, indicando que solo una cantidad poco mayor a un tercio del soluto está siendo encapsulada con este método de síntesis.

7.2 Carrera de micelio

En la carrera de micelio se observó un crecimiento acelerado en todos los tratamientos con NH_4NO_3 , siendo el tratamiento L 0.025% el que presentó mejor crecimiento con una colonización total del sustrato a los 16 días como lo muestra la figura 13.

Crecimiento de micelio en tubos de cultivo

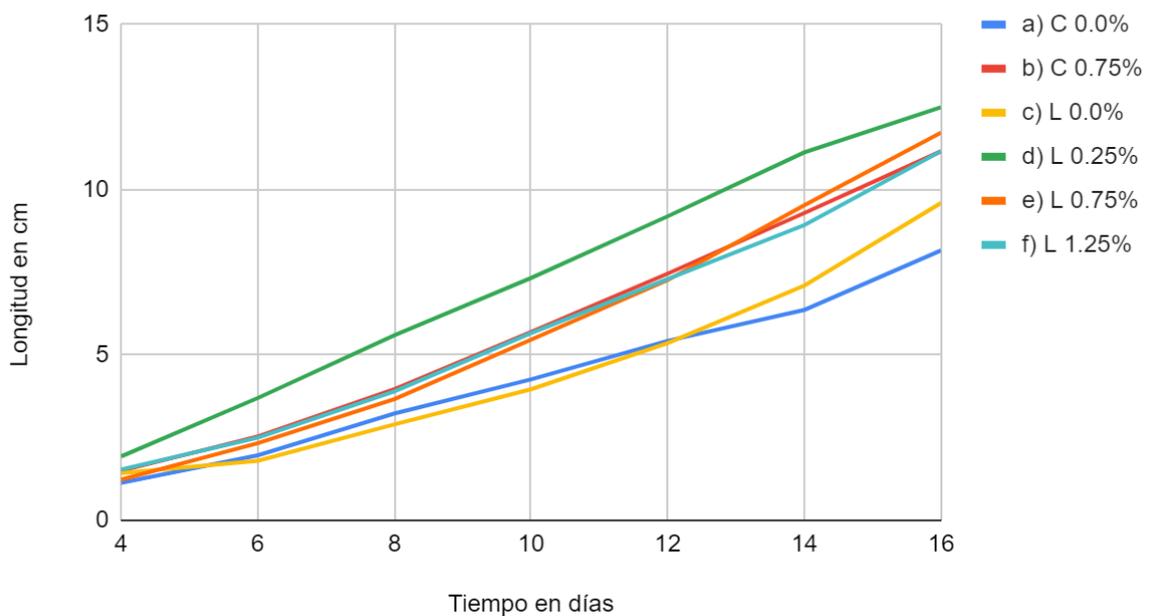


Figura 13. Curvas de crecimiento del micelio de cada tratamiento, en el eje vertical la longitud del micelio, en el eje horizontal el tiempo en días.

Tabla 3. Resumen de análisis de varianza ANOVA de un factor.

ANOVA simple, Resumen ($p= 1.3 \times 10^{-6}$)				
Grupos	Frecuencia	Sumatoria	Promedio	Varianza
L 0.25%	3	23,436	7,8120	0
L 0.75%	3	21,999	7,3333	0,032448
L 1.25%	3	20,935	6,9783	0,086408
L 0.0%	3	17,999	5,9997	0,191656
C 0.75%	3	20,93	6,9767	0,046633
C 0.0%	3	15,312	5,1040	0,172948

Los resultados del ANOVA Tabla 3, mostraron que existen diferencias significativas entre los tratamientos, con un valor de $p < 0.05$ para el crecimiento de micelio por día (mm/día) Tabla 4, mientras que la prueba de Duncan permitió identificar los tratamientos significativamente diferentes entre sí dividiéndolos en 4 grupos homogéneos (Figura 14).

Tabla 4. Crecimiento de micelio por día de cada réplica.

Crecimiento de micelio por día (mm/día)						
Réplica	C 0.0%	C 0.75%	L 0.0%	L 0.25%	L 0.75%	L 1.25%
1	4,75	6,75	6,50	7,81	7,44	6,75
2	5,00	7,18	5,81	7,81	7,44	6,88
3	5,56	7,00	5,69	7,81	7,13	7,31

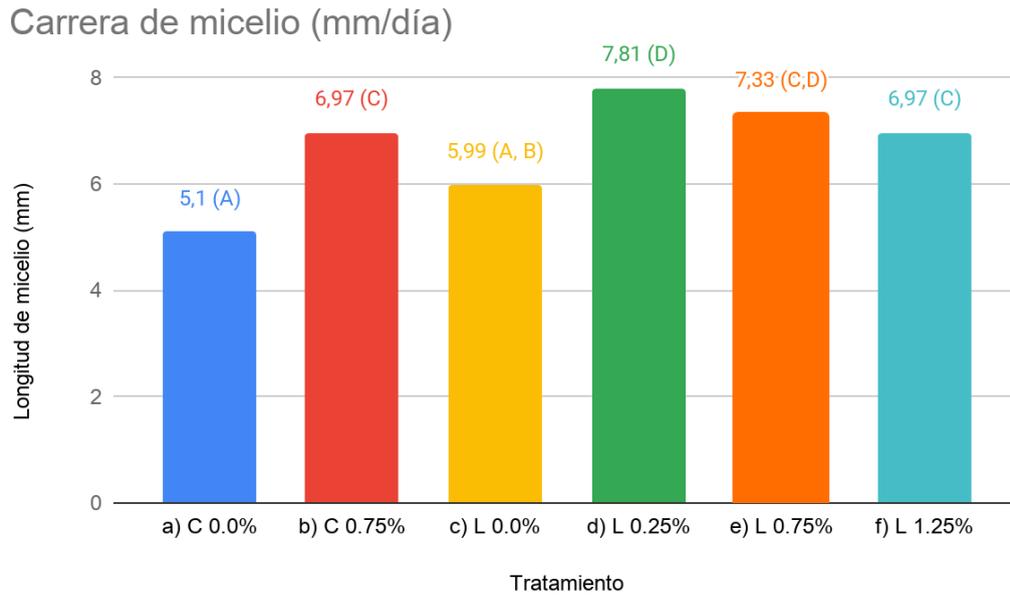


Figura 14. Gráfico de barras del desarrollo de micelio en mm/día; sobre las barras se encuentra la velocidad de crecimiento promedio seguida de su grupo homogéneo (A,B,C,D), letras diferentes representan diferencias significativas entre los datos.

La prueba de Duncan confirmó que la aplicación de NH_4NO_3 como aditivo al sustrato tiene un efecto positivo en el desarrollo de micelio, también se identificó que el desempeño del tratamiento L 0.25% es significativamente superior al tratamiento C 0.75%, indicando que la encapsulación de NH_4NO_3 tiene un efecto sobre la disponibilidad de este en el sustrato.

Como observación meramente cualitativa, los cultivos tratados presentaron mayor densidad micelial en comparación con el control (C 0.0%) como se muestra en la figura 15.



Figura 15. Cultivos de *P. ostreatus* al día 12; tratamientos de izquierda a derecha L 0.25%, L 0.75%, L 1.25%, C 0.75%, L 0.0%, C 0.0%.

8. Discusión

8.1 Efecto de la aplicación de NH_4NO_3 en el desarrollo de micelio

La implementación de NH_4NO_3 tanto libre como encapsulado demostró tener un efecto positivo en el desarrollo del micelio con los tratamientos C 0.75% y L 0.25% presentando crecimiento 26% y 34% más rápido con respecto al tratamiento control (C 0.0%) respectivamente.

De los resultados se destaca que la velocidad de crecimiento de micelio se comportó de forma contraintuitiva al no ser proporcional con la concentración de NH_4NO_3 en los tratamientos, sin embargo, comportamientos similares de desproporcionalidad entre el desarrollo del hongo y la concentración de N en el medio ha sido reportado anteriormente [55].

A su vez este tipo de resultados pueden ser explicados frecuentemente obteniendo la tasa carbono-nitrógeno en el sustrato, este parámetro se refiere a la cantidad de C que hay en el sustrato en comparación con la de N (C/N) y diferentes tasas C/N tienen diversos efectos en el desarrollo del hongo, como pueden ser el desarrollo de cuerpo fructífero, actividad enzimática, producción de aminoácidos y polisacáridos así como el desarrollo de micelio [56]. Incluso está reportada la incidencia de una “super inhibición” del desarrollo de micelio para sustratos en los que hay más N que C disponible [57]. Por lo que es posible que el tratamiento L 0.25% haya aportado una cantidad de N más cercana a la concentración C/N ideal para el desarrollo de micelio de *P. ostreatus* en comparación con los otros tratamientos.

Cabe mencionar que para esta investigación no se calculó la concentración de C en el sustrato inicial, sin embargo, para sustratos como el aserrín o la madera está reportada una relación

C/N de 100-400/1 [56,58,59] y para el desarrollo óptimo de micelio ha sido reportado en sustratos con una relación 30/1 C/N [56,57], sin embargo, es complejo asegurar que el tratamiento L 0.25% se aproximó a esta relación C/N debido a la limitada información de la composición del sustrato así como del efecto de aditivos de liberación controlada en la producción de hongos.

Parte de la complejidad para la interpretación de resultados de esta prueba es que la suplementación de aditivos de forma nanoestructurada no siempre tendrá un análogo de suplementación en bulto, es decir que la concentración de nitrógeno administrada mediante nanoestructuras no presentará una relación proporcional con concentraciones de nitrógeno aplicadas de forma convencional necesariamente [41], esto debido a que las nanoestructuras sobre todo el caso de nanocargadores como los liposomas tienen comportamientos variados en los que la dosificación del N en este caso se ve afectada por diversos factores ,incluyendo si el liposoma logra ser integrado a la célula objetivo o no; en caso de no ser así bajo qué condiciones se libera el aditivo que a su vez dependen de la permeabilidad de la capa lipídica, temperatura y presión osmótica por mencionar algunas.

Aun así, los resultados de la carrera de micelio indican una mejora en el desarrollo micelial de *P. ostreatus* con concentraciones de NH_4NO_3 muy bajas 0.25% reportada anteriormente como una concentración poco eficiente para la suplementación de sustratos en el cultivo de *P. ostreatus* [60].

9. Conclusiones

- La encapsulación en nanoliposomas fue exitosa con la formación de una suspensión estable (potencial $Z < -30$ mV) aún utilizando lecitina de soya de grado alimenticio.
- La implementación de los liposomas cargados con NH_4NO_3 como aditivo para el cultivo de *P. ostreatus* promovió el desarrollo del micelio debido probablemente a una mejora en el aprovechamiento de nitrógeno en el sustrato logrando obtener un crecimiento de micelio acelerado añadiendo concentraciones más bajas de aditivo que las que se aplican tradicionalmente como se vio con el tratamiento L 0.25%.

10. Bibliografía

1. Mansoori, G. Ali. 2017. "An Introduction to Nanoscience and Nanotechnology." In , 3–20. doi:10.1007/978-3-319-46835-8_1.
2. *Nanoagronomy*. 2020. *Nanoagronomy*. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-030-41275-3.
3. Nie, Zhihong, Alla Petukhova, and Eugenia Kumacheva. 2010. "Properties and Emerging Applications of Self-Assembled Structures Made from Inorganic Nanoparticles." *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nnano.2009.453.
4. López-Mora, Y., Gutiérrez-Arenas, D.A. y Cuca-García, J.M. 2018. "Síntesis de Nanopartículas y Su Aplicación En La Nutrición Animal." *Agroproductividad* 11 (June).
5. Hamad, Alshammari Fanar, Jong Hun Han, Byung Chun Kim, and Irfan A. Rather. 2018. "The Intertwine of Nanotechnology with the Food Industry." *Saudi Journal of Biological Sciences*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.sjbs.2017.09.004.
6. Sekhon, Bhupinder S. 2010. "Food Nanotechnology - an Overview." *Nanotechnology, Science and Applications*.
7. Umagiliyage, Arosha Loku, Nathalie Becerra-Mora, Punit Kohli, Derek J. Fisher, and Ruplal Choudhary. 2017. "Antimicrobial Efficacy of Liposomes Containing D-Limonene and Its Effect on the Storage Life of Blueberries." *Postharvest Biology and Technology* 128 (June). Elsevier B.V.: 130–37. doi:10.1016/j.postharvbio.2017.02.007.
8. Pinilla, Cristian Mauricio Barreto, Roberta Cruz Silveira Thys, and Adriano Brandelli. 2019. "Antifungal Properties of Phosphatidylcholine-Oleic Acid Liposomes Encapsulating Garlic against Environmental Fungal in Wheat Bread." *International Journal of Food Microbiology* 293 (March). Elsevier B.V.: 72–78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.006.
9. Salama, Dina M., M. E. Abd El-Aziz, Fatma A. Rizk, and M. S.A. Abd Elwahed. 2021. "Applications of Nanotechnology on Vegetable Crops." *Chemosphere*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129026.
10. Mastronardi E., Tsae P., Zhang X., Monreal C., DeRosa M.C. (2015) Strategic Role of Nanotechnology in Fertilizers: Potential and Limitations. In: Rai M., Ribeiro C., Mattoso L., Duran N. (eds) *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14024-7_2
11. Díaz-Blancas, Vianney, Dora I. Medina, Erika Padilla-Ortega, Raquel Bortolini-Zavala, Melissa Olvera-Romero, and Gabriel Luna-Bárceñas. 2016. "Nanoemulsion Formulations of Fungicide Tebuconazole for Agricultural Applications." *Molecules* 21 (10). MDPI AG. doi:10.3390/molecules21101271.
12. Hazrati, Hossein, Mohammad Jamal Saharkhiz, Mehrdad Niakousari, and Mahmoodreza Moein. 2017. "Natural Herbicide Activity of *Satureja Hortensis* L. Essential Oil Nanoemulsion on the Seed Germination and Morphophysiological Features of Two Important Weed Species." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142 (August). Academic Press: 423–30. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.04.041.
13. Karny, Avishai, Assaf Zinger, Ashima Kajal, Janna Shainsky-Roitman, and Avi Schroeder. 2018. "Therapeutic Nanoparticles Penetrate Leaves and Deliver Nutrients to Agricultural Crops." *Scientific Reports* 8 (1). Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41598-018-25197-y.
14. Ahmad, Razi, Sukriti Srivastava, Shubhrima Ghosh, and Sunil Kumar Khare. 2021. "Phytochemical Delivery through Nanocarriers: A Review." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111389.

15. Khati, Priyanka, Parul, Pankaj Bhatt, Nisha, Rajeev Kumar, and Anita Sharma. 2018. "Effect of Nanozeolite and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Maize." *3 Biotech* 8 (3). Springer Verlag. doi:10.1007/s13205-018-1142-1.
16. DE NANO/MICROENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS, primera edición, 2017, Paginas 164-170
17. Home, Nanotechnology Product Database, accesado en marzo 2021. <https://product.statnano.com/>
18. Nanotechnology in Agriculture industry, Nanotechnology Product Database, accesado marzo, 2021. <https://product.statnano.com/industry/agriculture>.
19. Europe, In. 2015. "ObservatoryNANO Briefing August 2010 ObservatoryNANO Briefing August 2010," no. 2: 1–4.
20. Gogos, Alexander et al. "Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities." *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 60,39 (2012): 9781-92. doi:10.1021/jf302154y
21. Chopra, A.; Kundra, V.; Weiser, W.; Espina, P. "Supplement to the President's 2012 Budget".(April, 2012).
22. CopperKelp, Algas Pacific, accesado marzo 2021, <https://algaspacific.com/copperkelp/>
23. Xing, H., Hwang, K., & Amp, Lu, Y. "Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. *Theranostics*", 2016, 6(9), 1336-1352.
24. Sadzuka, Y., Hirama, R., & Amp, Sonobe, T. "Effects of intraperitoneal administration of liposomes and methods of preparing liposomes for local therapy". *Toxicology Letters*, 2002, 126(2), 83-90.
25. ScienceDirect Search Results - Keyword(nanocarrier), ScienceDirect, accesado marzo 2021, <https://www.sciencedirect.com/search?qs=nanocarriers&years=2020&lastSelectedFacet=years>
26. Elbayoumi, Tamer A., and Vladimir P. Torchilin. 2010. "Current Trends in Liposome Research." *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 605: 1–27. doi:10.1007/978-1-60327-360-2_1.
27. Akbarzadeh, Abolfazl, Rogaie Rezaei-Sadabady, Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour, Mohammad Samiei, Mohammad Kouhi, and Kazem Nejati-Koshki. 2013. "Liposome: Classification, Preparation, and Applications." *Nanoscale Research Letters* 8 (1). Springer New York LLC. doi:10.1186/1556-276X-8-102.
28. Bitounis, Dimitrios, Raphaelle Fanciullino, Athanassios Iliadis, and Joseph Ciccolini. 2012. "Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept." *ISRN Pharmaceutics* 2012 (February). Hindawi Limited: 1–11. doi:10.5402/2012/738432.
29. Ann-Marie Chacko, Elizabeth D. Hood, Blaine J. Zern, Vladimir R. Muzykantov, "Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation", *Current Opinion in Colloid*

& Interface Science, Volumen 16, Edición 3, 2011, Páginas 215-227, ISSN 1359-0294, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.01.008>.

30. Alba A. Vallejo, Jesus B. Velazquez, Tanya A. Camacho, “LIPOSOMAS.” TECNOLOGÍAS nins.” *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 91(4), 2669-2675. doi:10.1002/app.13449
31. Moosavian, Seyedeh Alia, and Amirhossein Sahebkar. 2019. “Aptamer-Functionalized Liposomes for Targeted Cancer Therapy.” *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd. doi:10.1016/j.canlet.2019.01.045.
32. Riaz, Muhammad Kashif, Muhammad Adil Riaz, Xue Zhang, Congcong Lin, Ka Hong Wong, Xiaoyu Chen, Ge Zhang, Aiping Lu, and Zhijun Yang. 2018. “Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review.” *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi:10.3390/ijms19010195.
33. Bellettini, Marcelo Barba, Fernanda Assumpção Fiorda, Helayne Aparecida Maieves, Gerson Lopes Teixeira, Suelen Ávila, Polyanna Silveira Hornung, Agenor Maccari Júnior, and Rosemary Hoffmann Ribani. 2019. “Factors Affecting Mushroom *Pleurotus* Spp.” *Saudi Journal of Biological Sciences*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.sjbs.2016.12.005.
34. Li, Jing, Xing He, Xiao Bin Liu, Zhu L. Yang, and Zhi Wei Zhao. 2017. “Species Clarification of Oyster Mushrooms in China and Their DNA Barcoding.” *Mycological Progress* 16 (3). Springer Verlag: 191–203. doi:10.1007/s11557-016-1266-9.
35. Wan Mahari, Wan Adibah, Wanxi Peng, Wai Lun Nam, Han Yang, Xie Yi Lee, Yik Kin Lee, Rock Key Liew, et al. 2020. “A Review on Valorization of Oyster Mushroom and Waste Generated in the Mushroom Cultivation Industry.” *Journal of Hazardous Materials* 400 (December). Elsevier B.V. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123156.
36. Luciane, Márcia, Lange Silveira, Sandra Aparecida Furlan, and Jorge Luiz Ninow. 2008. “Development of an Alternative Technology for the Oyster Mushroom Production Using Liquid Inoculum Desenvolvimento de Tecnologia Alternativa Para a Produção de Cogumelos Ostra Usando Inóculo Líquido.” *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* 28 (4): 858.
37. Gaitán, R, D Salmenes, R Pérez, and G Mata. 2006. *Manual Práctico Del Cultivo de Setas: Aislamiento, Siembra y Producción*. 1 era. ed. Xalapa, Veracruz, México: Instituto de Ecología, A. C.
38. Paredes-Juárez, Ana Karina, Elba Villegas-Villareal, Rubén Díaz-Godínez, and Gerardo Díaz-Godínez. 2017. “Applications of Laccase Enzymes of *Pleurotus Ostreatus*.” *Mexican Journal of Biotechnology* 2 (1). *Mexican Journal of Biotechnology*: 134–44. doi:10.29267/mxjb.2017.2.1.135.
39. Lee, Chan-Jung, Jong-Chun Cheong, Chang-Sung Jhune, Ji-Won Moon, Won-Sik Kong, Jang-Sun Suh, Gi-Chun Park, Yu-Su Shin, and Jeong-Hoon Lee. 2013. “Yields of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) on Addition Rate of *Juglans Mandshurica* Sawdust.” *Journal of Mushroom* 11 (4). The Korean Society of Mushroom Science: 219–25.

- doi:10.14480/jm.2013.11.4.219.
40. Yamanaka, Katsuji. 2017. "Cultivation of Mushrooms in Plastic Bottles and Small Bags." In *Edible and Medicinal Mushrooms*, 309–38. John Wiley & Sons, Ltd.
doi:10.1002/9781119149446.ch15.
 41. Bhat, Ravishankar, Raghunandan Deshpande, Sharanabasava V. Ganachari, Do Sung Huh, and A. Venkataraman. 2011. "Photo-Irradiated Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Edible Mushroom *Pleurotus Florida* and Their Antibacterial Activity Studies." *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2011. doi:10.1155/2011/650979.
 42. Naim, Layla, Mohammed A. Alsanad, Zeina El Sebaaly, Nidal Shaban, Sami Abou Fayssal, and Youssef N. Sassine. 2020. "Variation of *Pleurotus Ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. (1871) Performance Subjected to Different Doses and Timings of Nano-Urea." *Saudi Journal of Biological Sciences* 27 (6). Elsevier B.V.: 1573–79. doi:10.1016/j.sjbs.2020.03.019.
 43. Naim, Layla, Mohammed A. Alsanad, Nidal Shaban, Zeina El Sebaaly, Sami Abou Fayssal, and Youssef N. Sassine. 2020. "Production and Composition of *Pleurotus Ostreatus* Cultivated on Lithovit®-Amino25 Supplemented Spent Substrate." *AMB Express* 10 (1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. doi:10.1186/s13568-020-01124-1.
 44. Videla, C. "La volatilización de amoníaco: una vía de pérdida de nitrógeno en sistemas agropecuarios". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, 1994.
 45. Phan, Chia Wei, and Vikineswary Sabaratnam. 2012. "Potential Uses of Spent Mushroom Substrate and Its Associated Lignocellulosic Enzymes." *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-012-4446-9.
 46. Maftoun, Parisa, Roslinda Abd Malek, Helmi Johari Masry, Farid Agouillal, Avnish Pareek, Siti Zulaiha Hanapi, and Hesham A. El Enshasy. 2017. "Effect of Additives on *Pleurotus Ostreatus* Growth on Agar Medium." *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 12 (03). IOSR Journals: 106–10. doi:10.9790/3008-120304106110.
 47. Carrasco, Jaime, Diego C. Zied, Jose E. Pardo, Gail M. Preston, and Arturo Pardo-Giménez. 2018. "Supplementation in Mushroom Crops and Its Impact on Yield and Quality." *AMB Express*. Springer Verlag. doi:10.1186/s13568-018-0678-0.
 48. Curvetto, N. R., D. Figlas, R. Devalis, and S. Delmastro. 2002. "Growth and Productivity of Different *Pleurotus Ostreatus* Strains on Sunflower Seed Hulls Supplemented with N-NH₄⁺ and/or Mn(II)." *Bioresource Technology* 84 (2): 171–76.
doi:10.1016/S0960-8524(02)00013-5.
 49. Daum, Diemo. 1996. "Gaseous Nitrogen Losses from a Soilless Culture System in the Greenhouse." *Plant and Soil* 183 (1). Kluwer Academic Publishers: 69–78.
doi:10.1007/BF02185566.
 50. Brandelli A., Pinilla C.M.B., Lopes N.A. (2017) "Nanoliposomes as a Platform for Delivery

- of Antimicrobials.” In: Rai M., Alves dos Santos C. (eds) *Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70299-5_3
51. Boccalini, Giulia, Luca Conti, Costanza Montis, Daniele Bani, Andrea Bencini, Debora Berti, Claudia Giorgi, Alessio Mengoni, and Barbara Valtancoli. 2017. “Methylene Blue-Containing Liposomes as New Photodynamic Anti-Bacterial Agents.” *Journal of Materials Chemistry B* 5 (15). Royal Society of Chemistry: 2788–97. doi:10.1039/c6tb03367a.
 52. Panwar, Preety, Bhumiika Pandey, P. C. Lakhera, and K. P. Singh. 2010. “Preparation, Characterization, and in Vitro Release Study of Albendazole-Encapsulated Nanosize Liposomes.” *International Journal of Nanomedicine* 5 (1): 101–8. doi:10.2147/ijn.s8030.
 53. Soto-Cruz, Oscar, Gerardo Saucedo-Castañeda, José Luis Pablos-Hach, Mariano Gutiérrez-Rojas, and Ernesto Favela-Torres. 1999. “Effect of Substrate Composition on the Mycelial Growth of *Pleurotus Ostreatus*. An Analysis by Mixture and Response Surface Methodologies.” *Process Biochemistry* 35 (1–2): 127–33. doi:10.1016/S0032-9592(99)00043-6.
 54. Nguyen, Minh Hiep, Thi Huynh Nga Nguyen, In Cheon Hwang, Chi Bao Bui, and Huyn Jin Park. 2016. “Effects of the Physical State of Nanocarriers on Their Penetration into the Root and Upward Transportation to the Stem of Soybean Plants Using Confocal Laser Scanning Microscopy.” *Crop Protection* 87 (September). Elsevier Ltd: 25–30. doi:10.1016/j.cropro.2016.04.012.
 55. Déo, Ndikumana, and Kanani Faustin. 2015. “Effect of Substrates and Doses of Urea on Growth and Yield of an Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) in Greenhouse” 3 (August): 314–22.
 56. Bellettini, Marcelo Barba, Fernanda Assumpção Fiorda, Helayne Aparecida Maieves, Gerson Lopes Teixeira, Suelen Ávila, Polyanna Silveira Hornung, Agenor Maccari Júnior, and Rosemary Hoffmann Ribani. 2019. “Factors Affecting Mushroom *Pleurotus* Spp.” *Saudi Journal of Biological Sciences*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.sjbs.2016.12.005.
 57. ZANETTI, A.L.; RANAL, M.A. Suplementação da cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *Pleurotus* sp. “Florida”. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, p.959-964, 1997
 58. Barbarick, K.a. 2014. “Organic Materials as Nitrogen Fertilizers.” Colorado State University Extension, no. 40. <http://www.ext.colostate.edu/pubs/Crops/00546.html>.
 59. Naraian, R., R. K. Sahu, S. Kumar, S. K. Garg, C. S. Singh, and R. S. Kanaujia. 2009. “Influence of Different Nitrogen Rich Supplements during Cultivation of *Pleurotus Florida* on Corn Cob Substrate.” *Environmentalist* 29 (1): 1–7. doi:10.1007/s10669-008-9174-4.
 60. Zadražil, F. 1980. “Influence of Ammonium Nitrate and Organic Supplements on the Yield of *Pleurotus Sajor Caju* (Fr.) Sing.” *European Journal of Applied Microbiology and*

Biotechnology 9 (1). Springer-Verlag: 31–35. doi:10.1007/BF00499999.