

Nanopartículas biogénicas a partir de *Trichoderma* spp. y su aplicación en el control de fitopatógenos de arroz y trigo

Tesis de Maestría en Biotecnología

B.C. Lic. Paula Sanguineto De Bellis

Facultad de Ciencias, UDELAR

Montevideo, Uruguay

Mayo 2023

Tutora: Dra. Silvana Alborés

Área de Microbiología
DEPBIO

Co-tutor: Dr. Eduardo Abreo

Plataforma de Bioinsumos
INIA Las Brujas

Agradecimientos

Agradezco a mi tutora, Silvana, y a mi co-tutor, Eduardo. Fue realmente un honor para mí aprender junto a ustedes. Gracias por el tiempo dedicado, por acompañarme siempre, por confiar en mí y por brindarme todas las herramientas posibles. Creo que en estos años formamos un lindo grupo de trabajo y nos supimos complementar muy bien.

Gracias Eduardo por tu paciencia, por tu dedicación y tu disposición. Por tu curiosidad y tu motivación. Gracias por permitirnos formar parte del Proyecto que sin dudas ha sido y es un gran desafío.

Gracias Silvana por estos casi diez años trabajando juntas. Además de mi tutora, te considero mi compañera. Siempre estás, y qué tranquilidad me da eso. Gracias Flavors por todo lo compartido, por tu calidez y tu contención. Por las oportunidades que me diste desde el primer día, por todo lo que me enseñaste y por tu paciencia infinita.

Agradezco a los miembros del Tribunal: Dr. Federico Battistoni, Dra. Nicole Lecot y Dra. Paula Rodríguez, por su disposición y por el tiempo dedicado.

A las Instituciones que permitieron financiar este trabajo: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de maestría y el Proyecto INNOVAGRO FSA_1_2018_1_152546, Comisión Académica de Posgrado (CAP) por la beca de finalización de maestría, a Posgrado Biotecnología y a PEDECIBA QUÍMICA.

A la Universidad de la República, por ser la Institución en la que me formé como profesional; donde también crecí en lo personal y que me permitió forjar hermosas amistades que hoy en día representan una parte muy importante de mi vida.

A la Dra. Sandra Lupo, la Dra. Silvia Pereyra y el Dr. Sebastián Martínez, por facilitarnos las cepas y por todos sus aportes en el marco del Proyecto INNOVAGRO. A Magdalena Olivera y a Beatriz Dini, por lo mucho que me ayudaron en la realización de mis ensayos experimentales en INIA.

Al Dr. Ricardo Faccio por su amabilidad, su disposición, y por las medidas de microscopía Raman. Agradezco también al Dr. Gustavo Mourglia y al Lic. Claudio Rodríguez-Camejo por supervisar los ensayos de citotoxicidad.

A todas y todos quienes integran el Área de Microbiología. En especial quiero agradecer a cada una de mis compañeras del Laboratorio 14 con las que coincidí desde el año 2014. Gracias gurisas por todo lo compartido en el día a día. Somos un gran equipo.

A Belén por su paciencia, su compañerismo y por salvarme más de una vez cuando la tecnología no estaba de mi lado. A Eloísa, por todos los kilómetros que corrimos juntas y por siempre hacerse un momento para ayudarme con mis resultados.

Agradezco a mis amigas y amigos por estar en mi vida y acompañarme siempre. A Ada, Sole, Sofi y Feli. Gracias por su incondicionalidad, por tener las palabras justas. Por compartir tan lindos momentos, y los no tan lindos, también. Qué orgullo nuestra amistad. A Agus y a Nacho, que ya son dos Karens más. A Carlos y a Diego, mis hermanos de la vida. Somos el grupo de Fisicoquímica con más aguante que haya existido jamás. A Lore y a Lea, gracias por siempre estar.

Por último quiero agradecer a mi familia por apoyarme y acompañarme en cada paso. A las mujeres de mi vida: a mamá, a la Titi y a mi hermana Lucía.

Resumen

Las partículas metálicas de escala nanométrica poseen propiedades ópticas y fisicoquímicas únicas, las cuales se fundamentan por su tamaño, características de superficie y estructura interna. A raíz de estas propiedades es que presentan diversas aplicaciones, siendo su estudio y desarrollo de gran interés en el área científica y tecnológica.

La creciente necesidad del desarrollo de soluciones tecnológicas novedosas de impacto reducido en el ambiente que permitan sustituir el desarrollo de agroquímicos y reducir los efectos negativos asociados a su uso continuado, es uno de los desafíos actuales a los que se enfrenta el sector agrícola. Trabajos recientes demuestran la potencial aplicación de nanopartículas metálicas en el control de fitopatógenos y promoción del crecimiento vegetal.

Existen diversos métodos físicos y químicos de producción de nanopartículas. Sin embargo, el uso de agentes tóxicos o las condiciones de reacción de algunos de estos métodos han llevado al desarrollo de alternativas de origen biológico con menor impacto ambiental. Una de ellas es la síntesis mediada por microorganismos. Particularmente, la síntesis utilizando hongos presenta algunas ventajas adicionales. La síntesis es extracelular, lo cual facilita el proceso de purificación y escalado. Adicionalmente, se obtienen nanopartículas estabilizadas por un *capping* proteico.

En el presente trabajo se realizó la biosíntesis de nanopartículas de plata y cobre a partir del medio extracelular del hongo *Trichoderma* spp. bajo diferentes condiciones de reacción. Para la caracterización de las nanopartículas biosintetizadas se utilizaron varias metodologías complementarias que permitieron determinar tamaño, distribución, análisis elemental, así como carga y composición del *capping* de las nanopartículas. Su actividad antifúngica fue evaluada frente a fitopatógenos que afectan cultivos de trigo y arroz. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar una cepa de *Trichoderma harzianum* efectiva en la síntesis de nanopartículas de plata y cobre. Estas nanopartículas presentaron estabilidad coloidal y actividad antifúngica *in vitro* frente a *Fusarium graminearum*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*. Asimismo se evaluó el tratamiento de semillas de arroz y trigo con estas nanopartículas, obteniendo resultados que hacen prometedora la posible aplicación de este tipo de productos de interés biotecnológico en el área agrícola.

Palabras clave: nanopartículas metálicas biogénicas; fitopatógenos, arroz, trigo

Índice general

Capítulo 1.....	1
1.1. Introducción	2
1.1.1. Nanopartículas metálicas	2
1.1.2. Síntesis biológica de nanopartículas	3
1.1.3. Caracterización y estabilidad coloidal.....	7
1.1.4. Aplicación de las nanopartículas metálicas como agentes antimicrobianos ..	9
1.1.5. Aplicaciones de la nanotecnología en el área agrícola.....	11
1.1.6. Relevamiento de cepas de hongos aislados en Uruguay para la biosíntesis de nanopartículas de plata	13
1.1.7. Síntesis biogénica de nanopartículas por <i>Trichoderma</i> spp.....	14
1.2. Hipótesis.....	16
1.3. Objetivos.....	16
1.3.1. Objetivo general.....	16
1.3.2. Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2.....	17
2. Materiales y métodos	18
2.1. Material biológico.....	18
2.2. Biosíntesis y purificación de nanopartículas metálicas.....	18
2.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata	18
2.2.2. Síntesis de nanopartículas de cobre.....	21
2.2.3. Purificación de las nanopartículas	22
2.3. Caracterización de las nanopartículas	23
2.3.1. Espectroscopía de absorbancia UV-Vis.....	23
2.3.2. SEM y HR-TEM-EDS	23
2.3.3. DLS y potencial zeta	23
2.3.4. Microscopía Raman Confocal	24
2.4. Actividad antifúngica	25
2.5. Efecto de las nanopartículas en la germinación de semillas de trigo y arroz.....	27
2.5.1. Ensayo <i>in vitro</i>	28
2.5.2. Ensayo en macetas.....	29
2.5.3. Análisis estadístico	30

2.6. Evaluación de citotoxicidad de las nanopartículas en líneas celulares humanas.....	31
2.7. Producción a mayor escala de nanopartículas metálicas de <i>Trichoderma harzianum</i> ILB 395	32
Capítulo 3.....	33
3. Resultados.....	34
3.1. Relevamiento de síntesis de nanopartículas de plata por <i>Trichoderma</i> spp.	34
3.1.1. Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de <i>Trichoderma</i> spp. y estabilidad coloidal.....	34
3.1.2. Purificación, estabilidad coloidal y caracterización primaria de las nanopartículas.....	37
3.1.3. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a microorganismos fitopatógenos de plantas de arroz y trigo.....	40
3.2. Síntesis de nanopartículas metálicas por <i>Trichoderma harzianum</i> ILB 395 y <i>Trichoderma asperellum</i> ILB 397. Evaluación del efecto en semillas y toxicidad en líneas celulares humanas	44
3.2.1. Evaluación de síntesis de nanopartículas de cobre	44
3.2.2. Efecto de las nanopartículas en semillas de trigo y arroz	46
3.2.3. Evaluación de la toxicidad en líneas celulares humanas	53
3.4. Selección de nanopartículas metálicas de <i>Trichoderma harzianum</i> ILB 395: caracterización complementaria, control de fitopatógenos y aplicaciones en campo.....	56
3.4.1. Caracterización complementaria de nanopartículas.....	56
3.4.2 Producción a mayor escala de nanopartículas metálicas de <i>Trichoderma harzianum</i> ILB 395	64
Capítulo 4.....	65
4.1. Discusión de resultados	66
4.2. Conclusiones.....	74
4.3. Perspectivas.....	75
Referencias bibliográficas.....	76

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de metodología de biosíntesis de nanopartículas metálicas.....	20
Figura 2. Reacción de síntesis de CuNPs.....	21
Figura 3. Esquema de procedimiento de purificación de nanopartículas.	22
Figura 4. Esquema de determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por microplaca de titulación de fondo plano.....	26
Figura 5. Estudio del efecto de las nanopartículas en el crecimiento de fitopatógenos.	26
Figura 6. Tratamiento de semillas de arroz y trigo para estudiar el efecto en la germinación.	27
Figura 7. Estudio de germinación en placa de semillas tratadas.....	28
Figura 8. Sistema de estudio de germinación en maceta de semillas tratadas.....	29
Figura 9. Esquema de metodología <i>in vitro</i> MTT empleada para el estudio de citotoxicidad de AgNPs con la línea celular THP-1.....	31
Figura 10. Variación de absorbancia a $\lambda = 440$ nm en función del tiempo durante la reacción de síntesis de AgNPs empleando AgNO_3 1mM, 5 mM, y 10 mM.....	35
Figura 11. Espectros UV-vis de las reacciones de síntesis de las AgNPs de la cepa ILB 395 a distintas concentraciones de AgNO_3	36
Figura 12. Espectro de absorción del extracto extracelular de la cepa ILB 395 con AgNO_3 5mM. En (a), hora 0 de reacción de síntesis. En (b), transcurridas 96 horas del inicio de la reacción.....	36
Figura 13. Espectro correspondiente a AgNPs producidas antes de centrifugar, (a) cepa ILB 404, (c) cepa ILB 396, y después de centrifugar, (b) cepa ILB 404, (d) cepa ILB 396. ..	38
Figura 14. Imágenes de AgNPs obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	39
Figura 15. Evaluación de actividad antifúngica en placa de AgNPs 395 y AgNPs 397 frente a <i>R. oryzae-sativae</i>	42
Figura 16. Espectros UV-vis para la síntesis de nanopartículas de cobre (a) luego de 24 y 48 h de reacción, (b) reacciones a diferentes pH.....	45
Figura 17. Efecto de las nanopartículas de plata en la germinación de semillas de arroz..	47
Figura 18. Efecto de las nanopartículas de plata en la germinación de semillas de trigo...	48
Figura 19. Efecto de las nanopartículas de cobre en la germinación de semillas de trigo..	49
Figura 20. Efecto de las nanopartículas de cobre en la germinación de semillas de arroz.	49

Figura 21. Sistema de macetas empleado para el estudio de germinación de plantas de trigo y arroz a partir de semillas tratadas.....	50
Figura 22. Gráfico de plantas de trigo emergidas a partir de semillas que recibieron distintos tratamientos.	51
Figura 23. Gráfico de plantas de arroz emergidas a partir de semillas que recibieron distintos tratamientos.	53
Figura 24. Estudio de toxicidad celular dosis-dependiente de las AgNPs con la línea celular THP-1.....	55
Figura 25. Análisis por (a) y (b) SEM, (c) y (d) HR-TEM (EDS) AgNPs y CuONPs producidas a partir de la cepa ILB 395.....	57
Figura 26. DLS de AgNPs (a) y CuONPs (b) en solución.....	58
Figura 27. Potencial zeta de AgNPs (a) y CuONPs (b) en solución.	59
Figura 28. Espectros Raman obtenidos por CRM de AgNPs a 532 nm.....	60
Figura 29. CRM de CuONPs 395.	61
Figura 30. Aspersión de AgNPs 395 sobre un cultivar de arroz de INIA Treinta y Tres.	64
Figura 31. Resumen del proceso de selección de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en función de los resultados obtenidos.....	69

Índice de tablas

Tabla 1. Evaluación de condiciones para AgNPs sintetizadas por hongos.....	6
Tabla 2. CIM de las AgNPs frente a <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Pyricularia oryzae</i> ...	41
Tabla 3. Actividad antifúngica de las AgNPs frente a <i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i> y <i>Sclerotium oryzae</i>	43
Tabla 4. Análisis estadístico realizado para el contraste de las muestras de AgNPs (plantas de trigo).	52
Tabla 5. Análisis estadístico realizado para el contraste de las muestras de AgNPs (plantas de arroz).	53
Tabla 6. CIM contra <i>F. graminearum</i> y <i>P. oryzae</i>	63
Tabla 7. Actividad antifúngica de AgNPs y CuONPs contra <i>R. oryzae-sativae</i> y <i>S. oryzae</i>	63

Abreviaturas

AFM – *Atomic Force Microscopy* - Microscopía de Fuerzas Atómicas

AgNPs – Nanopartículas de plata

CIM – Concentración Inhibitoria Mínima

CRM – *Confocal Raman Microscopy* – Microscopía Raman Confocal

CuNPs – Nanopartículas de cobre

CuONPs – Nanopartículas de óxido de cobre

DLS – *Dinamic Light Scattering* - Dispersión Dinámica de Luz

EDS – *Energy Dispersive Spectroscopy* - Espectroscopía de Dispersión de Energía

MHB – *Mueller-Hinton Broth* – Caldo Mueller-Hinton

PDA – *Potato Dextrose Agar* -Agar Papa Dextrosa

PDB – *Potato Dextrose Broth* – Caldo Papa Dextrosa

PDI – *Polydispersity Index* - Índice de Polidispersidad

RPS – Resonancia de Plasmón Superficial

SEM –*Scanning Electron Microscopy* - Microscopía Electrónica de Barrido

SERS – *Surface-Enhanced Raman Scattering* – Dispersión Raman Enaltecida en la Superficie

TEM – *Transmission Electron Microscopy* - Microscopía Electrónica de Transmisión

XRD – *X Ray Diffraction* – Difracción de Rayos X

Capítulo 1.

1.1. Introducción

1.2. Hipótesis

1.3. Objetivos

1.1. Introducción

1.1.1. Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas son agregados de material en escala nanométrica, con al menos una de sus dimensiones en el rango de 1 a 100 nm.

Dicha escala les otorga una mayor área superficial y les confiere además propiedades únicas: mecánicas, químicas, eléctricas, ópticas, magnéticas, electro-ópticas, y magneto-ópticas, diferentes a las de sólidos de misma composición pero de mayor tamaño (Zhang, et al., 2020). En base a estas propiedades es que se les atribuyen a las nanopartículas diversas aplicaciones en tecnología (desarrollo y mejora de dispositivos electrónicos), salud (biosensores, liberación controlada de fármacos, antimicrobianos), en industria alimentaria (formando parte de aditivos y empaques), y en agronomía (control de fitopatógenos y promoción de crecimiento vegetal) (Khan, et al., 2020).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son agregados de átomos de plata (Ag^0) que presentan alta eficiencia absorbiendo y dispersando la luz, un efecto conocido como resonancia de plasmón de superficie (RPS). La absorción de la luz varía significativamente con el tamaño, forma y distancia entre nanopartículas (Cao, et al., 2011). Estas propiedades ópticas permiten el uso de dichas partículas metálicas en el desarrollo de biosensores, diagnóstico y tratamiento de cáncer (hipertermia óptica) y la liberación controlada de fármacos, entre otras (Boca-Farcu, et al., 2014; Liu, et al., 2014; Sripriya, et al., 2013). Por un lado, los biosensores son capaces de sensor con gran efectividad a proteínas difíciles de detectar por otros sensores de distinta composición. Esta característica le aporta elevada sensibilidad, permitiendo así su uso en la detección de anomalías y enfermedades. En el caso de la terapia, las AgNPs pueden ser conjugadas a las células blanco (por ejemplo células tumorales) y bajo la estimulación de la luz a una cierta longitud de onda, transformar esa luz absorbida en energía térmica, produciendo así la ablación de las células blanco (Prabhu & Poulouse, 2012).

Asimismo, es sabido que el cobre metálico y los óxidos de cobre presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, y estudios recientes indican que esta actividad se vería potenciada en forma de nanopartículas de cobre (CuNPs). A diferencia de las AgNPs, las CuNPs en general han sido menos estudiadas y

presentan como ventaja que el cobre es un elemento esencial para la vida de los organismos, por lo que es de gran interés profundizar en su estudio para su aplicación tanto en el área de la salud como agrícola (Cuevas, et al., 2015). En la agricultura se ha utilizado para controlar oomycetes, hongos y bacterias durante más de un siglo, desempeñando un papel importante en el manejo integrado de plagas (La Torre, et al., 2018; Lamichhane, et al., 2018). Sin embargo, debido a su acumulación en el suelo, es necesario el desarrollo de tecnologías de formulación innovadoras con contenidos reducidos de cobre. Una estrategia para maximizar su eficacia es reduciendo el tamaño de las partículas del principio activo para mejorar la cobertura de las superficies tratadas. Las partículas pequeñas con altas relaciones superficie/volumen, como las nanopartículas de cobre, podrían representar una ventaja al reducir la cantidad total de cobre elemental necesaria para obtener el mismo efecto (La Torre, et al., 2018).

1.1.2. Síntesis biológica de nanopartículas

La síntesis de nanomateriales puede ser llevada a cabo mediante dos estrategias generales, conocidas como *top-down* y *bottom-up*. En la *top-down*, se parte de una estructura grande la cual es fraccionada en partes cada vez más pequeñas hasta llegar a nanoestructuras. Por otro lado, en la síntesis de tipo *bottom-up* el proceso es inverso. Se parte de estructuras de nivel atómico y mediante diversas metodologías de reacción se obtiene el nanomaterial (Zhang, et al., 2020).

Estas metodologías pueden ser químicas, físicas o biológicas, aunque en los últimos años ha cobrado mayor protagonismo la síntesis mediada por entidades biológicas (Dhillon, et al., 2012). Esto se debe fundamentalmente a que los métodos químicos y físicos pueden requerir agentes reductores, solventes orgánicos y agentes estabilizantes de elevada toxicidad y potencialmente carcinogénicos, siendo entonces procesos de mayor impacto económico, medioambiental y biológico (Khan, et al. 2020). Es así que los mecanismos de síntesis biológica (también conocida como síntesis verde) surgieron de modo de atender a la necesidad de encontrar alternativas confiables, seguras y de menor impacto en el ambiente (Balakumaran, et al. 2016). La estructura básica de las nanopartículas metálicas biogénicas consiste en un centro metálico (también conocido como *core*) y una

envoltura o *capping* que se encuentra rodeando al *core* y cuya naturaleza química está directamente asociada a las propiedades (Durán, et al., 2023).

Actualmente se encuentran reportadas síntesis biológicas a partir de hongos, bacterias, plantas, algas y virus (Zhang, et al., 2020). Dhillon et al. (2012) plantean que la biosíntesis realizada por hongos presenta considerables ventajas. Los hongos pueden secretar mayores cantidades de proteínas, lo que podría traducirse entonces en una mayor producción de nanopartículas. Además, las proteínas forman parte del *capping* de las nanopartículas, actuando como agentes estabilizantes (Balakumaran, et al., 2016; Shanthi, et al., 2016).

Asimismo, algunas de las AgNPs que han sido sintetizadas por hongos han presentado amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos patógenos de humanos y plantas (Rodrigues, et al., 2013), así como actividad citotóxica contra células cancerosas (Gurunathan et al., 2013).

Si bien los mecanismos de biosíntesis de nanopartículas han sido estudiados, aún no se encuentran en todos los casos dilucidados. Asimismo, en muchos casos se ha demostrado que proteínas microbianas del microorganismo empleado para la síntesis actuarían como agentes estabilizantes en la formación de dichas nanopartículas (Duran et al., 2023; Balakumaran, et al., 2016; Shanthi, et al., 2016). Algunos estudios de mecanismos biológicos en bacterias muestran que las enzimas reductasas están involucradas en la producción de AgNPs biogénicas. Por ejemplo, se reportaron reacciones de síntesis enzimática producidas por células de *Bacillus licheniformis* a través de una nitrato reductasa dependiente de NADH o una nitrato reductasa purificada de *Pseudomonas aeruginosa* (Ali & Waseem, 2017). Además, Quinteros et al. (2019) informaron que algunas proteínas del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* serían relevantes en la formación de AgNPs y en su estabilización.

Aunque se ha propuesto que varias enzimas y proteínas pueden participar en la síntesis de AgNPs por hongos, el mecanismo de síntesis que involucra a la enzima nitrato reductasa dependiente de NADH ha sido ampliamente aceptado (Rai, et al., 2021). Uno de los primeros estudios de mecanismos de síntesis extracelular fúngica fue realizado por Durán et al. (2005) quienes demostraron que *Fusarium oxysporum* era capaz de sintetizar AgNPs, pero no así *Fusarium moniliforme*. Para

avanzar en la elucidación del mecanismo, evaluaron tanto la actividad de la nitrato reductasa como la producción de quinonas. De acuerdo con los resultados obtenidos, propusieron como posible mecanismo de biosíntesis la conjugación de antraquinona como lanzadera de electrones para reducir Ag^+ a Ag^0 con la actividad NADPH reductasa dependiente (Durán, et al., 2005). Si bien los mecanismos de síntesis extracelular deben estudiarse para cada hongo utilizado, generalmente involucran enzimas nitrato reductasa, NADH o NADPH y quinonas. Además, la síntesis biogénica de AgNPs por hongos consta de dos pasos: la reducción de los iones de plata en las nanopartículas y el recubrimiento de las nanopartículas sintéticas (agente de protección o *capping*) (Rai, et al., 2021). Se cree que estos mismos mecanismos estarían involucrados en la síntesis de CuNPs; sin embargo, la tendencia espontánea que presenta el cobre a oxidarse hace más factible su síntesis en la forma de óxido de cobre (CuO), siendo +2 el estado de oxidación del cobre (Khodashenas, et al., 2014; Zhang, et al., 2020; Usman, et al., 2013).

Además de los mecanismos extracelulares, existen algunos mecanismos propuestos para la síntesis intracelular de nanopartículas metálicas por hongos. Por ejemplo, en la síntesis intracelular por *Fusarium* spp., las nanopartículas generalmente se forman en las cercanías de la membrana celular lo que puede deberse a la reducción de los iones metálicos producida por enzimas presentes en la membrana plasmática. Por lo tanto, se ha propuesto un mecanismo de dos pasos para la síntesis intracelular de nanopartículas en *Fusarium* spp.: un primer paso de unión de iones metálicos a la superficie de la célula fúngica a través de la interacción electrostática entre residuos de lisina e iones metálicos como Ag^+ , y un segundo paso en el que los iones metálicos se reducen dando lugar a la formación de nanopartículas biogénicas (Rai, et al., 2021).

1.1.2.1. Influencia de las condiciones de reacción en la síntesis de nanopartículas

Si bien la síntesis de AgNPs utilizando microorganismos es simple y efectiva, los parámetros utilizados en el procedimiento pueden optimizarse para lograr un buen rendimiento, monodispersidad, estabilidad y biocompatibilidad de las nanopartículas, así como repetibilidad de la síntesis (Barabadi, et al., 2019). Entonces, la evaluación de las condiciones de biosíntesis es muy importante para el desarrollo de procedimientos consistentes, ya que las características de las

nanopartículas obtenidas serán determinantes de las propiedades de las nanopartículas y por ende de sus aplicaciones (Ottoni, et al., 2017). El control del tamaño y forma de las nanopartículas requiere un ajuste de los parámetros utilizados en el crecimiento microbiano y en la reacción de síntesis (Ibrahim, et al., 2021). Parámetros como pH, temperatura, concentración de nitrato de plata (AgNO_3), agitación, entre otros, pueden ser evaluados y estandarizados para cada proceso de síntesis desarrollado. Estos parámetros pueden influir tanto en la tasa de síntesis como en el tamaño y la estabilidad de las nanopartículas producidas (Garg, et al., 2020). La **Tabla 1** muestra la evaluación de diferentes condiciones reportadas para AgNPs sintetizadas por hongos.

Tabla 1. Evaluación de condiciones para AgNPs sintetizadas por hongos.

Hongo	Condiciones	Respuesta	Referencia
<i>Isaria fumosorosea</i>	✓ pH ✓ Temperatura ✓ Agitación	- Cambio de color - RPS en espectro UV-vis	Banu & Balasubramanian, 2014
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	✓ Agitación ✓ Temperatura ✓ Concentración de AgNO_3	- Tamaño de nanopartículas	Chan & Don, 2013
<i>Punctularia atropurpurascens</i>	✓ Temperatura ✓ Concentración de AgNO_3 ✓ Tiempo de incubación	- RPS en espectro UV-vis	Sanguineto, et al., 2019
<i>Penicillium oxalicum</i>	✓ pH ✓ Temperatura ✓ Concentración de AgNO_3 ✓ Biomasa	- RPS en espectro UV-vis	Rose, et al., 2019
<i>Aspergillus fumigatus</i>	✓ pH ✓ Temperatura ✓ Concentración de AgNO_3 ✓ Concentración de NaCl ✓ Biomasa ✓ Tiempo de incubación	- Tamaño de nanopartículas	Shahzad, et al., 2019
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	✓ Temperatura ✓ Concentración de AgNO_3 ✓ Tiempo de incubación	- RPS en espectro UV-vis	Estevez, et al., 2020

1.1.3. Caracterización y estabilidad coloidal

Como fuera descrito en la Sección 1.1.1., tanto la estabilidad coloidal como las propiedades ópticas dependen del tamaño, forma y distancia entre las nanopartículas y determinan su uso en diversas aplicaciones. Estudios previos demuestran que diferentes condiciones de reacción como pH, temperatura, fuerza iónica, concentración de nitrato de plata, agitación, etc. pueden afectar las características de las nanopartículas sintetizadas (Korbekandi, et al., 2013).

La caracterización de las nanopartículas puede ser realizada mediante diversas metodologías, las cuales son complementarias entre sí y permiten conocer distintas características del nanomaterial.

La espectroscopía UV-visible es una de ellas. Las propiedades plasmónicas de las nanopartículas metálicas proporcionan un método simple para monitorear su síntesis y estabilidad coloidal a través de esta metodología. Por ejemplo, el cambio de color en la mezcla de reacción así como la aparición de una banda de absorción entre 400 y 450 nm correspondiente a la resonancia de plasmón superficial (RPS) son indicativos de la formación de AgNPs. Para ello se mide el espectro de absorbancia en el rango de 250-800 nm y se determina la evolución de la absorbancia en el pico máximo en función del tiempo (Estevez, et al., 2020)

Para la caracterización de nanopartículas, además de la espectroscopia UV-visible, se utilizan diversas metodologías complementarias entre sí. En el caso de microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión dinámica de luz (DLS), difracción de rayos X (XRD) y potencial zeta, son utilizadas para determinar el tamaño, la distribución, la carga superficial y morfología de las nanopartículas (Kora, et al., 2010; Shanthi, et al., 2016). Asimismo, al TEM o SEM se le puede acoplar espectroscopía de dispersión de energía (EDS), que permite conocer la abundancia de los distintos elementos químicos presentes en la muestra (Awwad & Amer, 2020). Por otro lado, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la microscopía Raman confocal (CRM) son herramientas de gran utilidad para la caracterización de nanopartículas biogénicas, ya que brindan información sobre la naturaleza de los grupos funcionales superficiales que recubren las nanopartículas metálicas. La naturaleza de las AgNPs produce el fenómeno de dispersión Raman enaltecida en la superficie (denominado SERS), un

efecto amplificador que mejora la señal Raman de aquellos fragmentos moleculares cerca de la superficie de las AgNPs (*capping*). Por ejemplo, el análisis de CRM de las AgNPs producidas por *Phanerochaete chrysosporium* mostró una banda ubicada a 230 cm^{-1} atribuida al modo de estiramiento de Ag-N, y bandas ubicadas en la región de la huella digital atribuidas a la presencia de l-valina y l-alanina, que podrían provenir del extracto proteico fúngico (Estevez, et al., 2020). Con respecto a la estabilidad coloidal, su estudio es de interés debido a que las nanopartículas que no reúnan esta condición serán más propensas a la formación de agregados, disminuyendo el área superficial activa. Esto tiene como resultado un impacto directo negativo en sus propiedades como nanomateriales (Sivera, et al., 2014). Es sabido que existen mecanismos de agregación que se basan en la inestabilidad coloidal producida por un incremento en la fuerza iónica. Además, se ha demostrado que esta pérdida en la estabilidad puede originarse por un efecto dependiente de la naturaleza química del compuesto en contacto con las nanopartículas como ser la presencia de iones cloruro, que en el caso de las AgNPs forma AgCl (Botasini & Méndez, 2013). A su vez, al tratarse de nanopartículas biogénicas la estabilidad podría depender de la naturaleza bioquímica de la cubierta de la nanopartícula, que es lo que la estabiliza. Ejemplo de esto son los estudios realizados por Sivera et al. (2014), en los que se utiliza gelatina como agente estabilizante a pH ácido y se observa una pérdida de estabilidad como consecuencia de la protonación de la proteína presente en la superficie, llevando a la agregación. En resumen, modificaciones en la reacción de síntesis alteran consecuentemente características de superficie de las nanopartículas, incluyendo su estabilidad coloidal. La formación del *capping* se ve alterada y por ende también sus propiedades (Korbekandi, et al., 2013).

También se ha observado agregación de AgNPs después de la centrifugación con fines de purificación del medio de síntesis. Los espectros UV-vis son útiles para monitorear la estabilidad coloidal. La agregación de nanopartículas generará una disminución de la intensidad de la banda de RPS así como un desplazamiento del espectro visible hacia el infrarrojo. Por ejemplo, nuestro grupo (Sanguineto, et al., 2018) reportó el desplazamiento y ensanchamiento de la banda de RPS hacia el infrarrojo después de la centrifugación de algunas AgNPs fúngicas. Además, la purificación y concentración de AgNPs estables sintetizadas por *Penicillium*

expansum (PeNPs) fue reportada por Estevez et al. (2019); el espectro UV-vis post centrifugación mostró un aumento significativo en la banda de RPS a 439 nm. Adicionalmente se evaluó la estabilidad coloidal de las PeNPs a diferentes pH (3-9) y fuerza iónica (concentraciones de NaCl de 10-500 mM). De acuerdo con los resultados, no ocurrieron cambios relevantes en los espectros UV-vis, lo que demuestra que las nanopartículas se mantuvieron estables en condiciones relativamente amplias de pH y fuerza iónica (Estevez, et al., 2019).

1.1.4. Aplicación de las nanopartículas metálicas como agentes antimicrobianos

En las últimas décadas, la propagación de microorganismos patógenos y su desarrollo de resistencia a drogas terapéuticas se ha convertido en una problemática de suma relevancia en el área de la salud y la industria alimentaria. Esta situación hizo y continúa haciendo necesaria la búsqueda de estrategias alternativas para el control de dichos microorganismos (Gharpure, et al., 2020).

Las propiedades antimicrobianas inherentes de la plata son conocidas; es sabido que los iones plata y compuestos basados en plata son altamente tóxicos para los microorganismos, lo que los hace una excelente opción para múltiples roles. La plata es generalmente utilizada en forma de nitrato para inducir efecto antimicrobiano, pero al estar en forma de nanopartículas tiene la ventaja del incremento en el área superficial activa así como también un incremento en el potencial de penetración por su tamaño nanométrico. Es así que las nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana han cobrado mayor protagonismo en el área de salud e industria alimentaria, y son potenciales candidatas en el área agrícola (Usman, et al., 2020). En el sector agrícola normalmente existen pérdidas considerables de productos relacionadas con plagas y enfermedades que afectan las etapas de pre y post cosecha y por ende se reduce en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Parisi, et al., 2015). Esto obliga al productor a tomar acciones preventivas que aumentan los costos de producción y afectan la calidad y la durabilidad de los productos cosechados, siendo ésta una de las principales causas de inestabilidad en la empresa agrícola y del déficit alimentario mundial.

Se ha demostrado que varias clases de AgNPs sintetizadas a partir de microorganismos son eficaces contra diversos microorganismos (Guilger-Casagrande & Lima, 2019; Hamouda, et al., 2019; Esmail, et al., 2022). En un estudio realizado con AgNPs sintetizadas por *Lactobacillus plantarum* se evaluó la actividad bactericida frente a los patógenos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. De acuerdo con los resultados todos los microorganismos fueron susceptibles a AgNPs. Además, estas nanopartículas biogénicas fueron más efectivas que el antibiótico gentamicina, comúnmente utilizado para el tratamiento de infecciones por estos patógenos (Prema, et al., 2022). De manera similar, las AgNPs sintetizadas por los hongos *Punctularia atropurpurascens*, *Penicillium expansum* y *Phanerochaete chrysosporium* mostraron actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Sanguineto, et al., 2018; Sanguineto, et al., 2019; Estevez, et al. 2019; Estevez, et al., 2020). Recientemente, las AgNPs biogénicas demostraron efectos bacteriostáticos y bactericidas contra cepas multirresistentes de *Salmonella* Typhimurium (Estevez, et al., 2021).

Los mecanismos de acción antimicrobiana de las AgNPs son muy complejos y dependen, entre otros factores, de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas y del tipo de microorganismo implicado (Hajipour, et al., 2012; Navarro Gallón, et al., 2019). Se han realizado varios estudios de interacción de AgNPs con microorganismos blanco, que indican que los mecanismos de acción podrían implicar tanto la liberación de iones de plata por parte de las nanopartículas como exclusivamente la acción de las propias nanopartículas (Nagaprasad, et al., 2022). A diferencia de los antibióticos convencionales, las AgNPs no actúan de una sola manera, sino que involucran una combinación de diferentes mecanismos como la adhesión a la membrana celular provocando lisis, la penetración intracelular permitiendo la interacción y daño a biomoléculas como el ADN, proteínas y lípidos (Estevez, et al., 2019; Guilger-Casagrande & Lima, 2019; Thangavelu, et al., 2021; Begum, et al., 2022), la generación de especies reactivas de oxígeno (Quinteros, et al., 2016; Begum, et al., 2022) o la interacción con la cadena de transporte de electrones (Salleh, et al., 2020).

Varias técnicas permiten el estudio de los efectos de las AgNPs en células microbianas como TEM, SEM y AFM (Gonzalez Moreno, et al., 2019; Liu, et al., 2014). En este sentido, diversos estudios sobre la interacción entre AgNPs biogénicas y células bacterianas (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* por TEM y SEM ambiental y *Salmonella Typhimurium* por AFM) mostraron claramente la adherencia de las AgNPs a la superficie celular, la generación de poros en la pared y la pérdida de componentes citoplasmáticos provocando la muerte celular (Estevez, et al., 2019; Estevez, et al., 2020; Estevez et al., 2021). Otra herramienta muy útil es la microscopía Raman confocal (CRM), que permite obtener información química y estructural de diversos componentes celulares, como si fueran huellas dactilares moleculares (Vishnupriya, et al., 2013). Al comparar los espectros Raman de células bacterianas y de levadura tratadas y no tratadas con AgNPs biogénicas, se demostró que las bandas correspondientes a ácidos nucleicos, aminoácidos, polisacáridos y ácidos grasos cambiaron luego del tratamiento con las AgNPs (Estevez, et al., 2019; Estevez, et al., 2020; Estevez, et al., 2021).

1.1.5. Aplicaciones de la nanotecnología en el área agrícola

El uso de agroquímicos para el control de fitopatógenos que afectan a cultivos extensivos es actualmente uno de los recursos utilizados para el control de las enfermedades de las plantas. Sin embargo, el desarrollo de resistencia así como la contaminación de los recursos naturales y la exposición de los seres humanos a pesticidas tóxicos, ha llevado a la necesidad de investigar y desarrollar nuevas soluciones tecnológicas sustentables (Pestovsky & Martínez-Antonio, 2017; Kah, et al., 2019). De esta manera, la nanotecnología ha cobrado gran interés en el área en los últimos años. Como se mencionó anteriormente, los nanomateriales muestran propiedades únicas y estas propiedades les atribuyen potenciales aplicaciones en diversos campos (Zhang, et al., 2020). Se ha visto que en la agricultura podrían mejorar la productividad de los cultivos, previniendo enfermedades de las plantas o promoviendo su crecimiento, mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, los nanofertilizantes serían más eficientes que los fertilizantes convencionales al controlar la liberación de nutrientes en función de

los requerimientos de los cultivos. Las plantas podrían entonces absorber la mayoría de los nutrientes sin ninguna pérdida porque los nanofertilizantes los liberarían lentamente a lo largo del crecimiento del cultivo (Usman, et al., 2020). Por otro lado, los nanosensores hacen uso de las propiedades ópticas de las nanopartículas para la detección temprana de condiciones indeseables para el crecimiento de las plantas mediante la detección de compuestos químicos y biológicos específicos, pudiendo ser utilizados tanto en las plantas como en el suelo (Kah, et al., 2019). El hecho de realizar una detección temprana de factores negativos permitiría tomar los recaudos necesarios a tiempo. Los nanomateriales pueden también ayudar a reducir la toxicidad de los contaminantes orgánicos e inorgánicos al afectar su movilidad y toxicidad a través de diferentes mecanismos, siendo ampliamente utilizados en diversas estrategias para eliminar contaminantes de suelos (Usman, et al., 2020). Se sugiere que los nanomateriales también pueden mejorar la estructura y la salud del suelo al alterar la actividad enzimática y/o microbiana de manera beneficiosa, así como mejorando la retención de agua para las plantas (Parisi, et al., 2015). Seleccionar el nanomaterial para mitigar un contaminante particular en un contexto ambiental específico requiere un análisis completo del tipo y la cantidad de contaminante que se busca mitigar (Guerra, et al., 2018). De las aplicaciones más prometedoras de las nanopartículas metálicas y óxido metálicas en la agricultura es el control de fitopatógenos. Por lo tanto, la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc, dióxido de titanio, cobre y plata para el manejo de enfermedades de las plantas comprende una parte importante de la fitonanotecnología en la agricultura (Lahuta, et al., 2022). Las nanopartículas pueden utilizarse potencialmente como fungicidas, bactericidas e insecticidas.

Otra forma de utilizar nanomateriales como plaguicidas es mediante el desarrollo de *nanocarriers*. Muchos pesticidas y herbicidas convencionales tienen una solubilidad en agua limitada, y en estos casos por lo general se requiere un sistema portador (*carrier*). Los nanoportadores tienen una mayor solubilidad en agua. Este hecho posiblemente podría resultar en una mayor biodisponibilidad de los ingredientes activos. En algunos ensayos *in vitro* se observó que existía un efecto

sinérgico de nanopartículas de plata combinadas con antifúngicos comerciales, como ketoconazol y fluconazol (Usman, et al., 2020).

A pesar de todas las aplicaciones descritas, en Uruguay no se contaba con investigaciones de aplicaciones de Nanobiotecnología aplicada en el área agrícola. En este sentido, esta tesis realizada en colaboración entre UDELAR e INIA representa un primer acercamiento interdisciplinar en el uso de Nanobiotecnología para enfrentar desafíos con potencial aplicación en cultivos de nuestro país.

1.1.6. Relevamiento de cepas de hongos aislados en Uruguay para la biosíntesis de nanopartículas de plata

En el Uruguay existe una extensa trayectoria en Nanotecnología. Algunas de las investigaciones en esta área se han enfocado hacia tecnologías para celdas solares fotovoltaicas con base en nanomateriales, el desarrollo de biomateriales de reparación y regeneración tisular en reposición de material esquelético o de piel, el encapsulamiento de productos para nutrición, cosmética o sanidad animal, y el agregado de nanomateriales a matrices de materiales o productos convencionales, entre muchas otras (Mombrú, et al., 2013).

En particular en el área de Microbiología, nuestro grupo ha desarrollado estrategias nanotecnológicas para la purificación de proteínas microbianas (Alborés, et al., 2016), y realizó un primer relevamiento de cepas de hongos, aisladas de muestras provenientes de nuestro país, con capacidad de sintetizar AgNPs. Los resultados obtenidos de este relevamiento mostraron que extractos extracelulares de ocho cepas fúngicas fueron capaces de sintetizar nanopartículas de plata bajo las condiciones evaluadas (Sanguineto, et al., 2018).

A partir de dicho relevamiento se desarrolló una tesina de grado de Licenciatura en Química en la cual se estudiaron las condiciones de síntesis de nanopartículas de plata, su caracterización y estudio de su potencial antimicrobiano, utilizando el hongo *Punctularia atropurpurascens* (Sanguineto, 2018; Sanguineto, et al., 2019).

1.1.7. Síntesis biogénica de nanopartículas por *Trichoderma* spp.

En el presente trabajo se estudia la síntesis de nanopartículas de plata y cobre a partir de una colección de cepas de *Trichoderma* spp. Se trata de un hongo filamentoso perteneciente a la división ascomycota, biocontrolador por excelencia, que posee diversos mecanismos de defensa que le atribuyen esta característica. Elementos estructurales del propio hongo así como también metabolitos secundarios han sido utilizados para el control biológico de patógenos de plantas. Asimismo, otras propiedades benéficas hacia los vegetales han sido reportadas en varias cepas pertenecientes al género *Trichoderma*, como la actividad promotora del crecimiento vegetal (Zin & Badaluddin, 2020). Más recientemente se ha estudiado la posibilidad de producir nanopartículas metálicas de plata, cobre y otros elementos a partir de *Trichoderma* spp. que presenten actividad antifúngica y/o promotora de crecimiento vegetal (Guilger, et al., 2017; Nandini, et al., 2017).

Como se mencionó en la Sección 1.1.4, la efectividad antimicrobiana de las nanopartículas depende no solo de sus propiedades fisicoquímicas sino también del microorganismo objetivo (Pestovsky & Martínez-Antonio, 2017). Por ejemplo, Guilger-Casagrande et al. (2021) reportaron que las nanopartículas de plata biogénicas sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* mostraron actividad contra fitopatógenos que afectan cultivos extensivos, como *Sclerotinia sclerotiorum*. Además, se encontró que el *capping* de las AgNPs conteniendo biomoléculas funcionales de *Trichoderma harzianum* estaba directamente involucrado en la actividad antimicrobiana.

Es por ello que en esta tesis se busca, por un lado, ampliar el conocimiento sobre la colección de cepas de trabajo de Uruguay, cuya propiedad biocontroladora y promotora de crecimiento ya ha sido estudiada y caracterizada. Por otro lado, se busca evaluar una potencial aplicación en cultivos de arroz y trigo en Uruguay.

Para ello se estudió la capacidad de controlar fitopatógenos que afectan estos cultivos extensivos. Los fitopatógenos de arroz evaluados fueron el patógeno foliar *Pyricularia oryzae* y los patógenos de tallo *Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Nakataea oryzae* (sinónimo *Sclerotium oryzae*), cuyos esclerotos flotan y entran en contacto con el tallo, logrando penetrar y colonizar los tejidos, generando la enfermedad conocida como podredumbre del tallo de arroz. Esta enfermedad es una de las de

mayor relevancia del cultivo de arroz en nuestro país. Asimismo, *Fusarium graminearum* fue evaluado como fitopatógeno de trigo, siendo responsable de la enfermedad de fusariosis de trigo, la cual puede afectar tanto la germinación de semillas como las espigas, reduciendo la implantación, el rendimiento del grano, y produciendo micotoxinas. En Uruguay representa una de las principales limitantes para la producción de trigo y cebada (Martínez, 2021; Pereyra, et al., 2005; Escalante, et al., 2018).

1.2. Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo propone que se pueden sintetizar nanopartículas metálicas estables a partir del filtrado de biomasa de cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de cultivos de nuestro país, que presenten actividad antimicrobiana frente a microorganismos fitopatógenos de cultivos de arroz y trigo, y favorezcan el crecimiento vegetal.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Sintetizar nanopartículas metálicas biogénicas a partir de biomasa de *Trichoderma* spp. con actividad antimicrobiana para el control de fitopatógenos de arroz y trigo.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de síntesis de nanopartículas de plata y cobre a partir de cepas del género *Trichoderma* obtenidas de plantas de arroz y suelo rizosférico
- Mejorar el rendimiento de la reacción mediante modificaciones en las condiciones de biosíntesis inicialmente planteadas
- Caracterizar las nanopartículas mediante diversas metodologías y estudiar la estabilidad
- Determinar su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a microorganismos fitopatógenos de plantas de arroz y trigo
- Estudiar la toxicidad de las nanopartículas

Capítulo 2.

2. Materiales y métodos

2. Materiales y métodos

2.1. Material biológico

Para la biosíntesis de nanopartículas se utilizó una colección de 11 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas a partir de muestras de planta y suelo de cultivos de arroz de INIA Treinta y Tres por la Dra. Sandra Lupo (UDELAR, Uruguay) y el Dr. Sebastián Martínez (INIA, Uruguay): *T. koningiopsis* (ILB 394, ILB 396), *T. harzianum* (ILB 395, ILB 404, ILB 409, ILB 412, ILB 416, ILB 421), *T. asperellum* (ILB 397) y *Trichoderma* sp. (ILB 423, ILB 424). Como fitopatógenos a evaluar se estudiaron cepas fúngicas responsables de enfermedades en cultivos de arroz y trigo. Los patógenos de arroz evaluados fueron *Rhizoctonia oryzae-sativae* (cepa ILB 428), *Sclerotium oryzae* (cepa ILB 425) y *Pyricularia oryzae* (cepa Po290), proporcionados por el Dr. Sebastián Martínez (INIA, Uruguay). Se evaluó también *Fusarium graminearum* (cepa 02020) como fitopatógeno de trigo, proporcionado por la Dra. Silvia Pereyra (INIA, Uruguay).

2.2. Biosíntesis y purificación de nanopartículas metálicas

2.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata

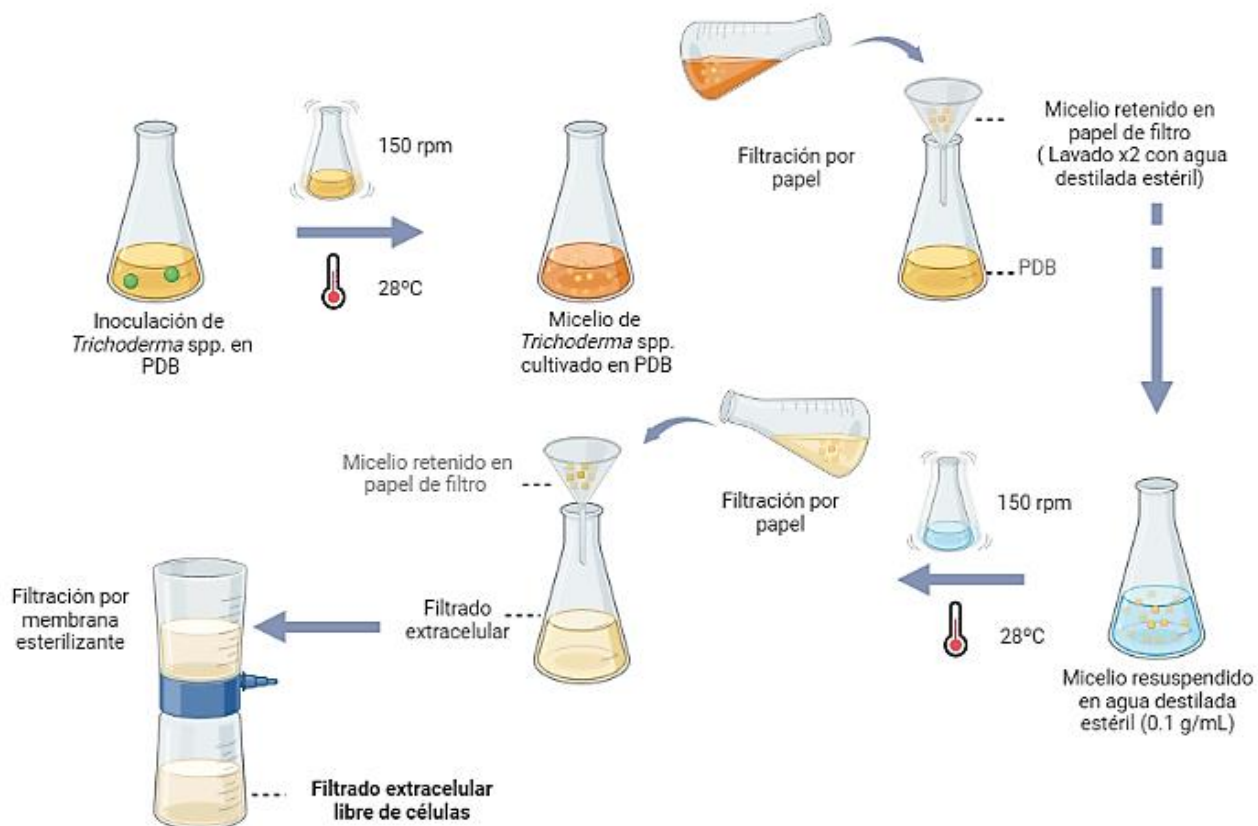
Para la biosíntesis, inicialmente se realizó el cultivo de todas las cepas de *Trichoderma* spp. descritas anteriormente en medio sólido *Potato Dextrose Agar* – PDA (OXOID®). Luego se extrajeron discos de micelio de dicho cultivo y se inocularon dos discos de 0.9 cm de diámetro en 100 mL de medio líquido *Potato Dextrose Broth* – PDB (Sigma-Aldrich®).

El crecimiento se llevó a cabo a 28 °C, con agitación constante en un agitador orbital que funcionó a 150 rpm durante 72 horas. La biomasa de los cultivos se recogió por filtración y luego se lavó dos veces con agua destilada estéril para eliminar cualquier componente restante del medio de cultivo.

La síntesis de AgNPs se llevó a cabo como fuera reportado por nuestro grupo (Sanguineto, et al, 2018). Los micelios fúngicos húmedos se suspendieron en agua destilada esterilizada (0,1 g/mL) y se incubaron con agitación constante a 150 rpm durante 48 h. Posteriormente el micelio fue separado por filtración con papel de la fase líquida, y a dicha fase se le realizó una segunda etapa de filtración con un filtro de membrana con tamaño de poro de 0,45 μm (Millipore), obteniendo como

resultado un extracto extracelular libre de células. Finalmente, el extracto fue separado en dos fracciones, de las cuales a una se le agregó igual volumen de agua destilada estéril (control de reacción) y a la otra se le añadió igual volumen de una solución de nitrato de plata (AgNO_3) como sustrato de la síntesis. Tres concentraciones de AgNO_3 fueron evaluadas para la reacción: 1, 5 y 10 mM. Las mezclas se incubaron en oscuridad a 28°C. El seguimiento de las reacciones de síntesis fue llevado a cabo mediante la obtención de espectros de absorbancia en el rango de 250-800 nm y midiendo el incremento de absorción en el pico de longitud de onda máximo (correspondiente al pico de RPS de las nanopartículas sintetizadas) a lo largo del tiempo. (**Figuras 1(a) y (b)**). En el caso de las AgNPs, esta banda se observa entre 400-450 nm. Cuando se dejaron de observar aumentos en el pico de RPS, se dio por finalizada la síntesis.

(a) Obtención de extracto extracelular de *Trichoderma* spp.



(b) Reacción de síntesis de AgNPs

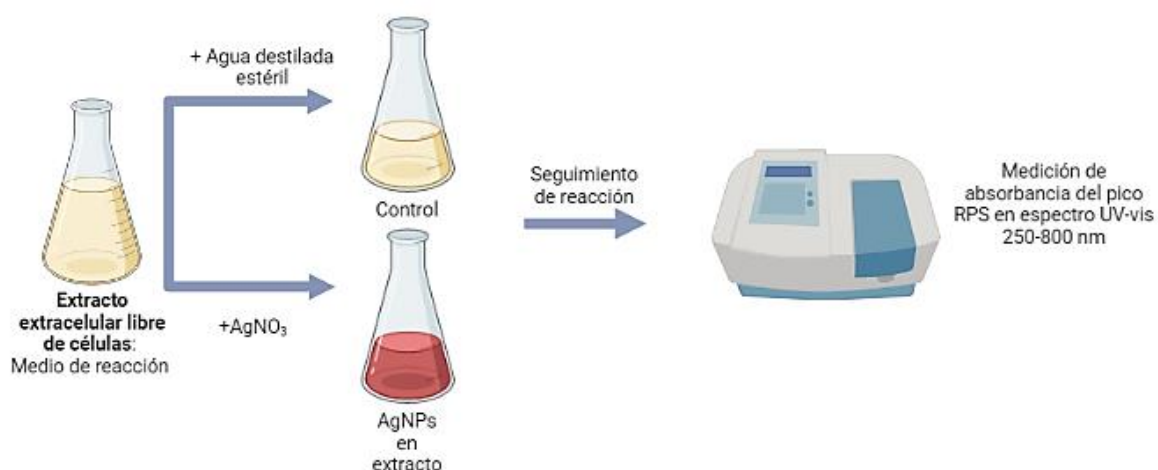


Figura 1. Esquema de metodología de biosíntesis de nanopartículas metálicas. En **(a)** se muestra la obtención del extracto extracelular a partir de *Trichoderma* spp.; en **(b)** la reacción de síntesis de AgNPs.

Creado con BioRender.com

2.2.2. Síntesis de nanopartículas de cobre

Con base en el mismo protocolo, la síntesis de nanopartículas de cobre se realizó reemplazando AgNO_3 por CuCl_2 5 mM, y a diferentes condiciones de pH (5, 7 y 9) en la reacción de síntesis, según lo informado por Cuevas, et al. (2015) (**Figura 2**). Las cepas utilizadas para la síntesis fueron *T. harzianum* ILB 395 y *T. asperellum* ILB 397. El seguimiento de las reacciones de síntesis fue llevado a cabo mediante la obtención de espectros de absorbancia en el rango de 250-800 nm y midiendo el incremento de absorción en el pico de longitud de onda máximo (correspondiente al pico RPS de las nanopartículas sintetizadas) en función del tiempo.

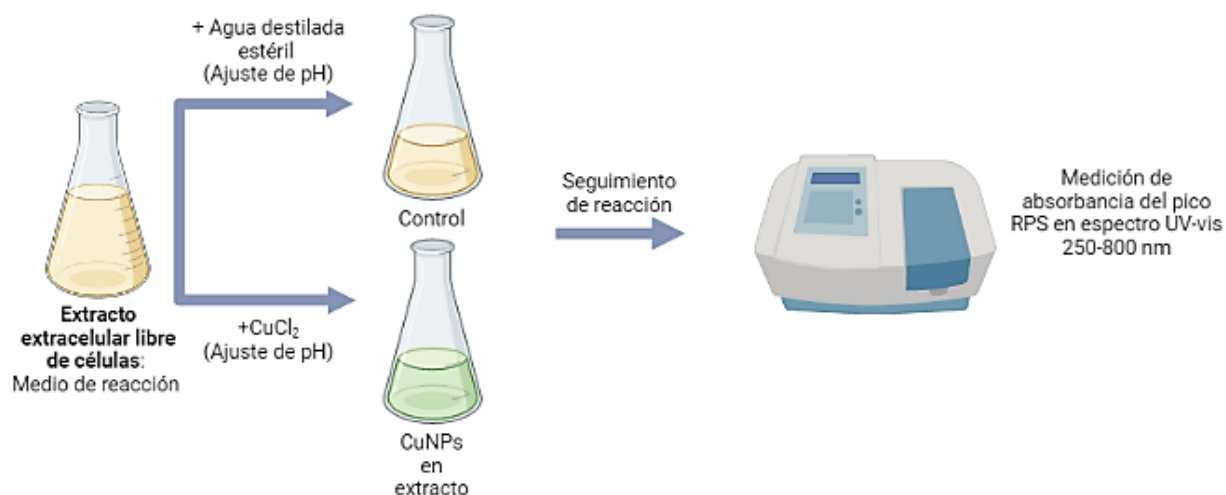


Figura 2. Reacción de síntesis de CuNPs.

Creado con BioRender.com

2.2.3. Purificación de las nanopartículas

Una vez que se dieron por finalizadas las síntesis de nanopartículas, las muestras fueron purificadas, es decir, separadas del medio de reacción en el que se sintetizaron (extracto fúngico). Para ello fueron centrifugadas a 11140 g durante veinte minutos. Se eliminó el sobrenadante y las nanopartículas fueron resuspendidas en agua destilada y centrifugadas durante diez minutos a 11140 g. Este paso de lavado se realizó dos veces consecutivas. Posteriormente se resuspendieron las nanopartículas ya purificadas en agua destilada y se midió el pico de absorbancia correspondiente a la banda de RPS. Se estimó la concentración según (Paramelle, et al., 2014) (**Figura 3**).



Figura 3. Esquema de procedimiento de purificación de nanopartículas.

Creado con BioRender.com

2.3. Caracterización de las nanopartículas

2.3.1. Espectroscopía de absorbanza UV-Vis

Los espectros de absorbanza se midieron en el espectrofotómetro UV/Visible *Jenway 6715* en el rango de 250-800 nm, con el fin de monitorear la formación de nanopartículas evidenciada por el pico de RPS de las nanopartículas metálicas.

2.3.2. SEM y HR-TEM-EDS

Para el análisis por SEM se utilizó un microscopio electrónico *JEOL JSM-5900LV* (servicio de Microscopía de Facultad de Ciencias, UDELAR). Se colocó un volumen de 10 μ L de las suspensiones de nanopartículas en una rejilla y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para el análisis HR-TEM, las muestras se resuspendieron en etanol 95%, fueron completamente secadas y luego observadas con un microscopio electrónico *JEOL JEM 2100* (servicio de Microscopía de CURE Rocha, UDELAR) de 200 kV de tensión de aceleración, utilizando rejilla de cobre (para AgNPs) o níquel (para CuNPs). Además, se estudió la composición química elemental con una sonda EDS de rayos X en la superficie de las nanopartículas. Luego, los tamaños de las nanopartículas se determinaron mediante análisis de las imágenes por ambas microscopías electrónicas utilizando el software *Image J*.

2.3.3. DLS y potencial zeta

Se determinaron los diámetros hidrodinámicos y las medidas del potencial zeta de las nanopartículas. Para la determinación de DLS, cada muestra se midió a 25 °C, 3 veces, combinando 5 corridas por medición (*ZetaSizer*, Facultad de Química, UDELAR). En el caso del potencial zeta, cada muestra se midió a 25 °C, 3 veces, combinando 10 corridas por medición. Los resultados se trataron utilizando el software *Zetasizer* de *Malvern*.

2.3.4. Microscopía Raman Confocal

Las mediciones se realizaron en el microscopio *Alpha 300 RA WITec Raman* utilizando un láser de excitación de 532 nm enfocado a través de un objetivo de 100X y estuvieron a cargo del Dr. Ricardo Faccio (CentroNanomat, ITP, Facultad de Química, UDELAR). Se depositó una alícuota de nanopartículas sobre un soporte de aluminio y se secó a temperatura ambiente para su análisis. La potencia del láser fue previamente calibrada con el fin de evitar la descomposición del material. Posteriormente, las muestras fueron examinadas dando como resultado imágenes Raman confocales de 40x40 micrómetros, procesadas utilizando una cuadrícula de 40x40 puntos.

2.4. Actividad antifúngica

Se determinó la mínima concentración de nanopartículas que causa inhibición del crecimiento de los microorganismos utilizando la técnica de microdilución (CLSI, 2017) en microplacas de titulación de fondo plano (NUNC-*Thermo Scientific*®). Para ello se realizaron diluciones seriadas de las nanopartículas purificadas en caldo *Mueller-Hinton Broth* – MHB (HIMEDIA®). Realizadas las diluciones, en los pocillos de la microplaca se sembraron además suspensiones de los fitopatógenos esporulados a evaluar (1×10^4 esporas/mL en suero fisiológico con *Tween* 20). Como controles se sembró el caldo de cultivo con y sin la suspensión de los microorganismos. Después de incubar durante 96 horas a 28 °C, se determinó la concentración mínima que provocó una inhibición visible del crecimiento microbiano (**Figura 4**). Esta actividad se llevó a cabo con todas las AgNPs obtenidas en el relevamiento, así como con las CuNPs, contra los hongos patógenos *Fusarium graminearum* y *Pyricularia oryzae*.

Además, se evaluaron los efectos de las nanopartículas sobre el crecimiento del micelio de los fitopatógenos no esporulados: *Sclerotium oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae*, según la metodología reportada por Mohammed, et al., 2019. Se inoculó un disco de 5 mm de micelio fresco de cada hongo en el centro de una placa conteniendo PDA suplementado con 1 mL de cuatro concentraciones diferentes (diluciones $1/4$, $1/8$, $1/16$) de nanopartículas y se incubó durante 5 días a 28 °C. También se incluyeron cultivos de control de las cepas fúngicas cultivadas en PDA. Transcurrido ese período, se midió el diámetro del micelio y se comparó con el control. El diámetro del crecimiento micelial en medio PDA sin nanopartículas representó el 100 % de crecimiento (0 % de inhibición) (**Figura 5**). La inhibición provocada por cada concentración de nanopartículas se expresó en porcentaje, en comparación con el control.

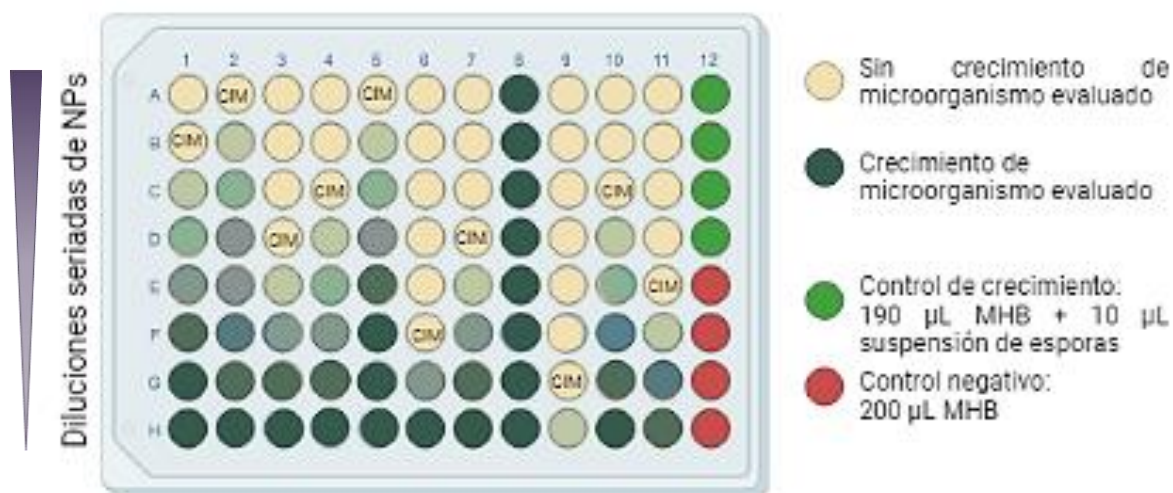


Figura 4. Esquema de determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por microplaca de titulación de fondo plano. En cada pocillo (excepto controles) se sembraron 100 µL de dilución seriada de NPs en MHB + 90 µL MHB + 10 µL suspensión de esporas.
Creado con BioRender.com

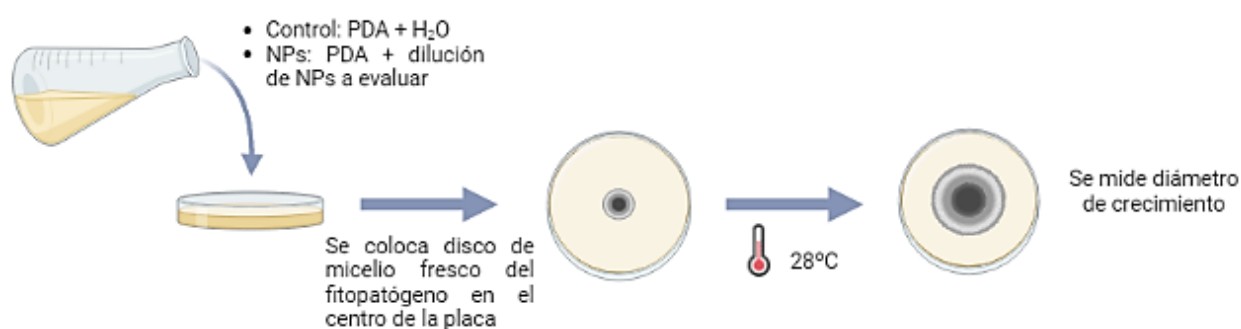


Figura 5. Estudio del efecto de las nanopartículas en el crecimiento de fitopatógenos.
Creado con BioRender.com

2.5. Efecto de las nanopartículas en la germinación de semillas de trigo y arroz

El efecto en la germinación de semillas de arroz y trigo tratadas con nanopartículas fue evaluado mediante dos tipos de ensayo, *in vitro* y en invernáculo. En ambos ensayos se utilizaron semillas de arroz (*Oriza sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*) de los cultivares comerciales INIA Tacuarí e INIA Génesis 4.33, respectivamente.

La forma en la que se realizó el tratamiento fue la misma tanto para el ensayo *in vitro* como para el de invernáculo, variando la respuesta evaluada (germinación de semilla y emergencia de la planta, respectivamente) (**Figura 6**).

Inicialmente las semillas se remojaron en agua destilada durante 10 minutos para ablandar su cubierta e iniciar el proceso de germinación. Luego, se sumergieron en soluciones de nanopartículas (0,14 η M AgNPs y 50 μ M CuNPs) durante 2 horas, según Spagnoletti et al. (2019). Se establecieron como controles semillas tratadas con agua destilada (blanco) y con solución de AgNO_3 5 mM o CuCl_2 5 mM (según se tratara de AgNPs o CuNPs).

Transcurridas las 2 horas de tratamiento, las semillas fueron removidas de las soluciones, se secaron con papel absorbente y se procedió con los ensayos descritos a continuación.



Figura 6. Tratamiento de semillas de arroz y trigo para estudiar el efecto en la germinación.

Creado con BioRender.com

2.5.1. Ensayo *in vitro*

Este ensayo fue realizado con AgNPs sintetizadas por dos cepas: *T. harzianum* ILB 395 y *T. asperellum* ILB 397 y CuNPs sintetizadas por *T. harzianum* ILB 395. El motivo de la elección de estas muestras en particular se encuentra propiamente descrito en el Capítulo 3.

Las semillas de trigo tratadas fueron colocadas en placas de Petri conteniendo PDA, mientras que las de arroz se colocaron en placas de Petri con agar agua. En cada placa se colocaron un total de diez semillas, totalizando tres placas por tratamiento, es decir, treinta semillas. Las placas se incubaron a 25 °C durante 6 días. Las semillas con coleóptilos y raíces de más de 2 mm se calificaron como positivas para la prueba (**Figura 7**).



Figura 7. Estudio de germinación en placa de semillas tratadas. Se muestra en la imagen (a modo de ejemplo) semillas de trigo germinando sobre PDA y cómo se realizó la lectura del ensayo.

2.5.2. Ensayo en macetas

Además de los ensayos *in vitro* descritos anteriormente, con las semillas tratadas con AgNPs sintetizadas por *T. harzianum* ILB 395 y *T. asperellum* ILB 397, también se realizó la siembra de las mismas en macetas. El ensayo fue realizado en el invernáculo de INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay. Para ello, para cada tratamiento se utilizaron dos bandejas con capacidad para 48 plantines para cada tratamiento (96 plantines en total). Las bandejas fueron rellenas con una mezcla de tres partes de turba, dos partes de arena y una de vermiculita, en la que fueron sembradas las semillas. Se regaron durante 14 días, momento en el que se realizó el recuento de plantines emergidos en las bandejas (**Figura 8**).



Figura 8. Sistema de estudio de germinación en maceta de semillas tratadas. La imagen corresponde al día 14 del ensayo, momento en el cual se realizó el recuento de plantines emergidos (apreciables en la imagen).

2.5.3. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron al menos por triplicado y se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Los resultados se representaron como valores medios con barras que representan las desviaciones estándar. Por otro lado, los datos obtenidos a partir de los ensayos descritos en el ítem anterior (2.5.2) se analizaron estadísticamente usando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo una distribución binomial y usando la función logit. Los tratamientos se compararon mediante la prueba DGC (Di Rienzo, et al., 2002) con un nivel de significación de 0,05. Para estos análisis se utilizó el software *InfoStat* (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

2.6. Evaluación de citotoxicidad de las nanopartículas de plata en líneas celulares humanas

La viabilidad celular de las células THP-1 se evaluó mediante la técnica *in vitro* de MTT, en la cual las células viables reducen al bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) a cristales púrpuras insolubles de formazán mediante acción enzimática (Gopinath, et al., 2017) (**Figura 9**).

Inicialmente se sembraron las células en una placa de 96 pocillos de fondo plano para cultivo celular y se incubó a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. Una vez adheridas las células a la superficie de la placa, se agregaron las nanopartículas a evaluar en diluciones seriadas en medio completo, por triplicado. La placa se incubó en iguales condiciones de temperatura y atmósfera durante 24 horas. Posteriormente se removió el contenido de los pocillos para agregar el MTT y se incubó la placa durante 3 horas. Luego de la incubación, se removió el sobrenadante de los pocillos y los cristales de formazán se solubilizaron con DMSO. Se midió la absorbancia de los pocillos a $\lambda = 560\text{nm}$, estableciendo una relación de viabilidad celular normalizada respecto al control negativo (células que no fueron expuestas a las nanopartículas).

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Inmunología de Facultad de Química (Instituto de Higiene) bajo la supervisión del Dr. Gustavo Mourglia y el Lic. Claudio Rodríguez-Camejo.



Figura 9. Esquema de metodología *in vitro* MTT empleada para el estudio de citotoxicidad de AgNPs con la línea celular THP-1.

Creado con BioRender.com

2.7. Producción a mayor escala de nanopartículas metálicas de *Trichoderma harzianum* ILB 395

Para avanzar en la posible aplicación de las nanopartículas a escala de campo se realizaron tres lotes de síntesis de AgNPs a partir de *T. harzianum* ILB 395.

Luego de la purificación de las nanopartículas según la metodología descrita en la Sección 2.2.3. del presente capítulo, se corroboró estabilidad y tamaño de las AgNPs mediante espectro UV-vis y medidas de DLS.

Finalmente se hizo un *pool* de todos los lotes y se midió volumen obtenido y concentración estimada de nanopartículas.

Estas muestras fueron suministradas a investigadores de INIA para su aplicación en cultivos de arroz en Treinta y Tres, Uruguay, en el marco del proyecto INNOVAGRO FSA_1_2018_1_152546.

Capítulo 3.

3. Resultados

3. Resultados

3.1. Relevamiento de síntesis de nanopartículas de plata por *Trichoderma* spp.

3.1.1. Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de *Trichoderma* spp. y estabilidad coloidal

Se realizó el relevamiento completo de las cepas de *Trichoderma* spp. para la síntesis de AgNPs, evaluando distintas concentraciones de AgNO_3 en la reacción (1, 5 y 10 mM).

Acorde a lo esperado por estudios previos, los picos correspondientes a la RPS de las AgNPs se encontraron en el entorno de 400-450 nm, por lo que se graficaron los valores de absorbancia a dicha longitud de onda en función del tiempo. De este modo es posible comparar la capacidad de síntesis de las distintas cepas evaluadas en iguales condiciones.

Como puede observarse en la **Figura 10**, los resultados son promisorios ya que todas las cepas evaluadas fueron capaces de sintetizar AgNPs. Sin embargo, al comparar los valores de absorbancia obtenidos, se decidió descartar a ILB 394 e ILB 424 por presentar, en todas las concentraciones evaluadas, valores de absorbancia inferiores a 0.200 a las 48 h. Asimismo, en los gráficos se observa que, en general, la síntesis se incrementó de forma más pronunciada en dicho período. En cuanto a la concentración de AgNO_3 a emplear, se obtuvieron mejores resultados con concentraciones de 5 mM y 10 mM, como se observa en el ejemplo de la **Figura 11**. El gráfico permite comparar los espectros UV-vis y las bandas correspondientes a la RPS para las distintas concentraciones de AgNO_3 empleadas, utilizando el extracto extracelular de la cepa ILB 395. A modo de ejemplo se presentan además los espectros obtenidos en el relevamiento de esta cepa al inicio de la reacción (**Figura 12 (a)**) y transcurridas las 96 horas (**Figura 12 (b)**). Como puede apreciarse, al inicio se observa un pico importante que abarca de los 240 nm a los 390 nm aproximadamente que se corresponde a componentes del extracto extracelular del hongo. Transcurridas 96 horas, se observa un nuevo pico en el espectro, el cual se encuentra en el entorno de los 440 nm y se corresponde con la banda de RPS de las AgNPs.

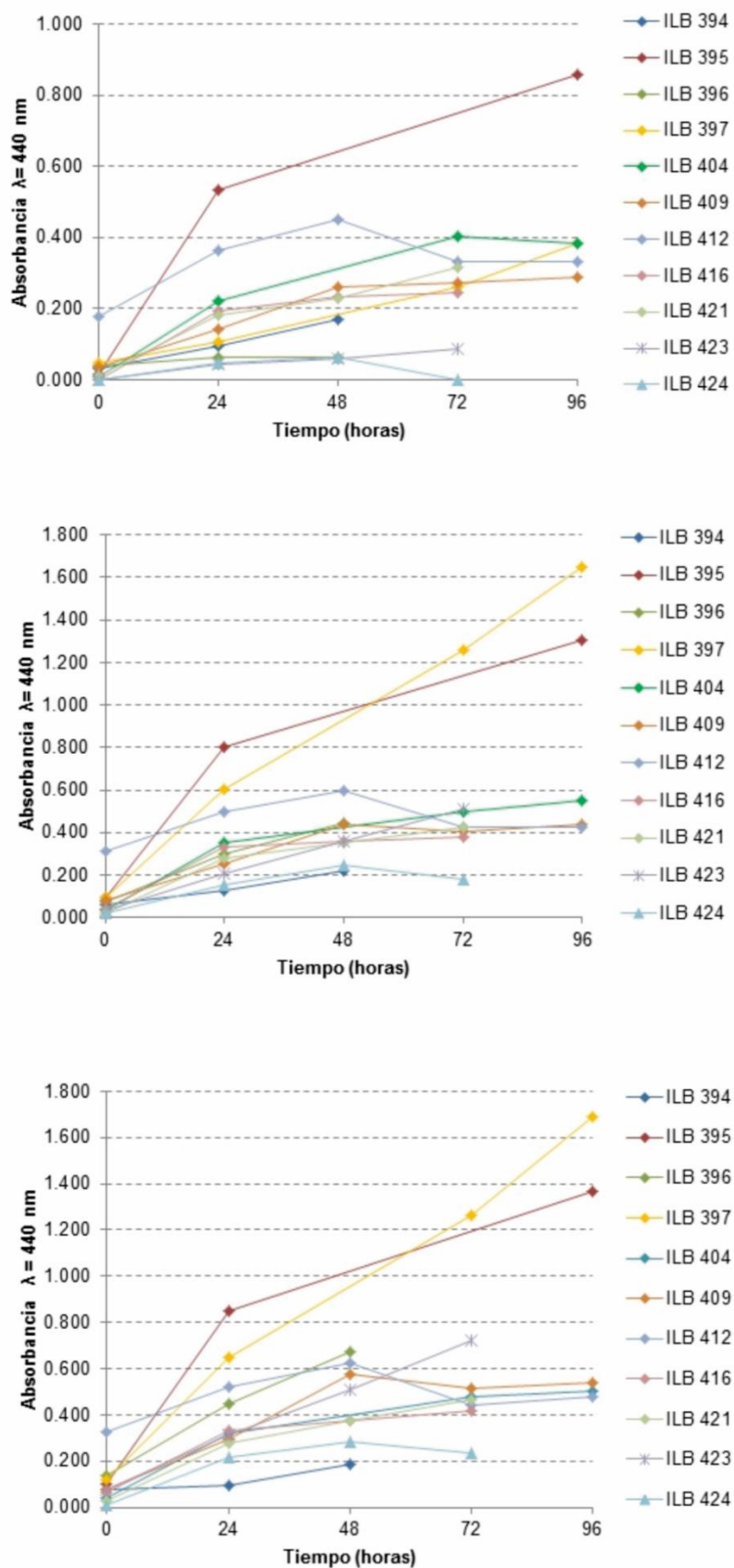


Figura 10. Variación de absorbancia a $\lambda = 440 \text{ nm}$ en función del tiempo durante la reacción de síntesis de AgNPs empleando AgNO_3 1mM (superior), 5mM (medio), y 10 mM (inferior).

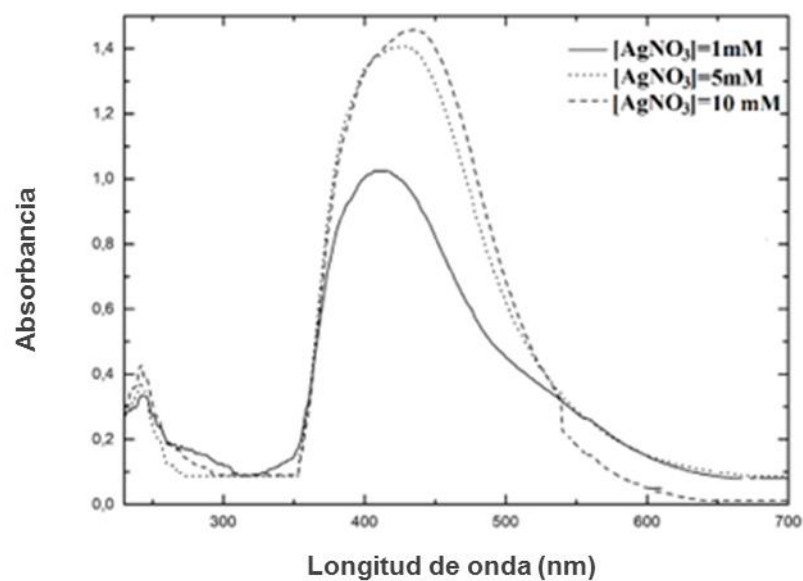


Figura 11. Espectros UV-vis de las reacciones de síntesis de las AgNPs de la cepa ILB 395 a distintas concentraciones de AgNO_3 . Se observa la banda de RPS a 440 nm.

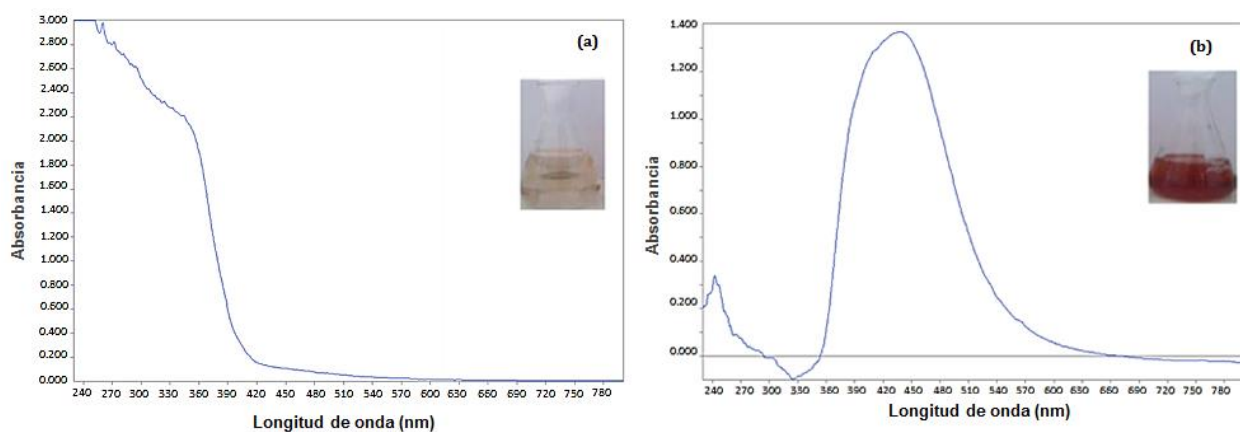


Figura 12. Espectro de absorción del extracto extracelular de la cepa ILB 395 con AgNO_3 5mM. En **(a)**, hora 0 de reacción de síntesis. La línea de base fue realizada con agua destilada. En **(b)**, transcurridas 96 horas del inicio de la reacción. La línea de base fue realizada con extracto extracelular (control).

3.1.2. Purificación, estabilidad coloidal y caracterización primaria de las nanopartículas

Finalizada la síntesis, las nanopartículas fueron centrifugadas, lavadas (para quitar el exceso de extracto y reactivos), y resuspendidas en agua.

Las nanopartículas que resultaron estables a dicho proceso fueron aquellas que resuspendieron correctamente en agua destilada y no presentaron alteraciones en el pico de RPS (**Figuras 13 (a) y 13 (b)**). En caso contrario, se observó macroscópicamente la presencia de aglomerados que no resuspendieron y/o un pico de RPS alterado en el espectro UV-visible (**Figuras 13 (c) y 13 (d)**).

En este paso fue descartada la cepa ILB 396, a partir de la cual no se obtuvieron nanopartículas estables al proceso de centrifugación.

Teniendo en cuenta que las cepas ILB 394 e ILB 424 fueron descartadas por su baja eficiencia en la síntesis de AgNPs, y que la cepa ILB 396 no produjo nanopartículas estables a las condiciones evaluadas, se continuó con los estudios de caracterización de las AgNPs purificadas provenientes de las cepas restantes (ILB 395, ILB 397, ILB 404, ILB 409, ILB 412, ILB 416, ILB 421, ILB 423) por SEM. Como se muestra en la **Figura 14**, en general se observaron nanopartículas principalmente esféricas, con diámetros promedio inferiores a 90 nm (analizados con el software *Image J*).

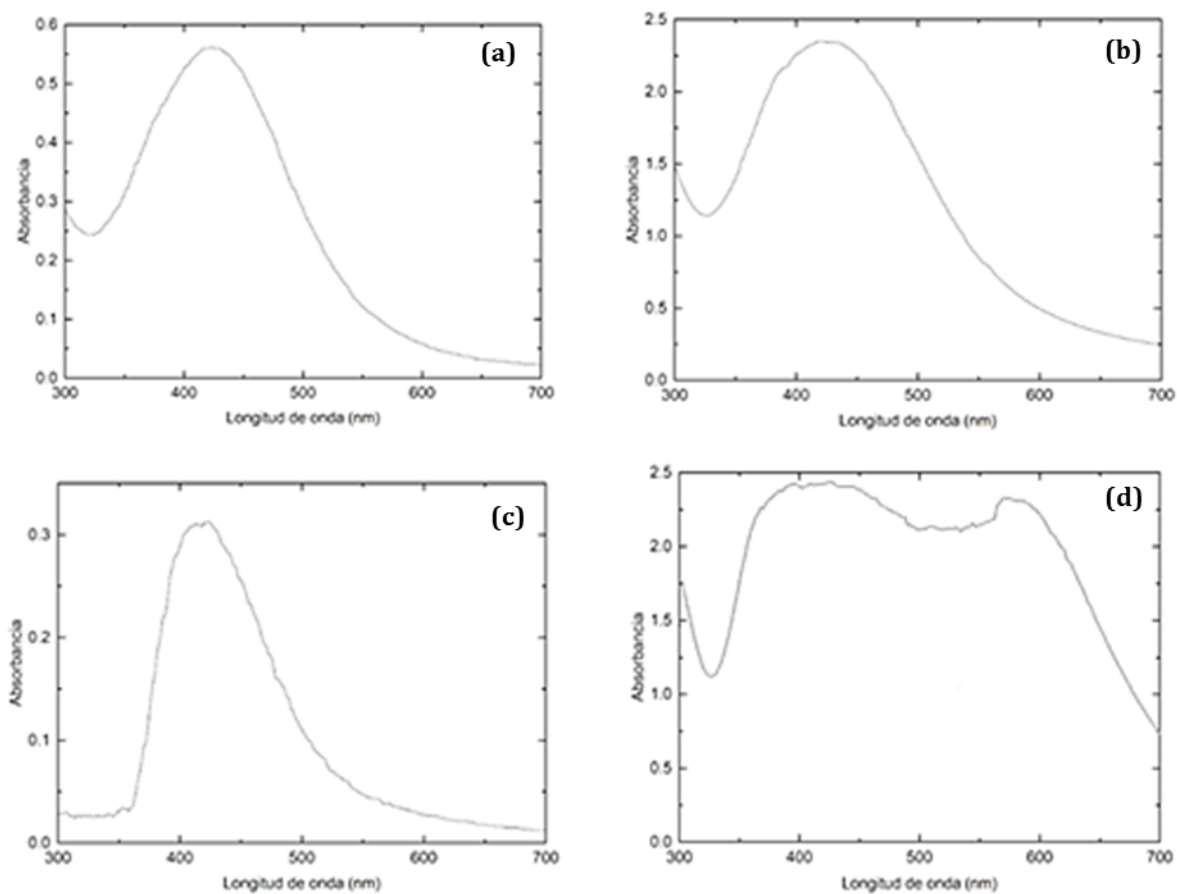


Figura 13. Espectro correspondiente a AgNPs producidas antes de centrifugar, **(a)** cepa ILB 404, **(c)** cepa ILB 396, y después de centrifugar, **(b)** cepa ILB 404, **(d)** cepa ILB 396.

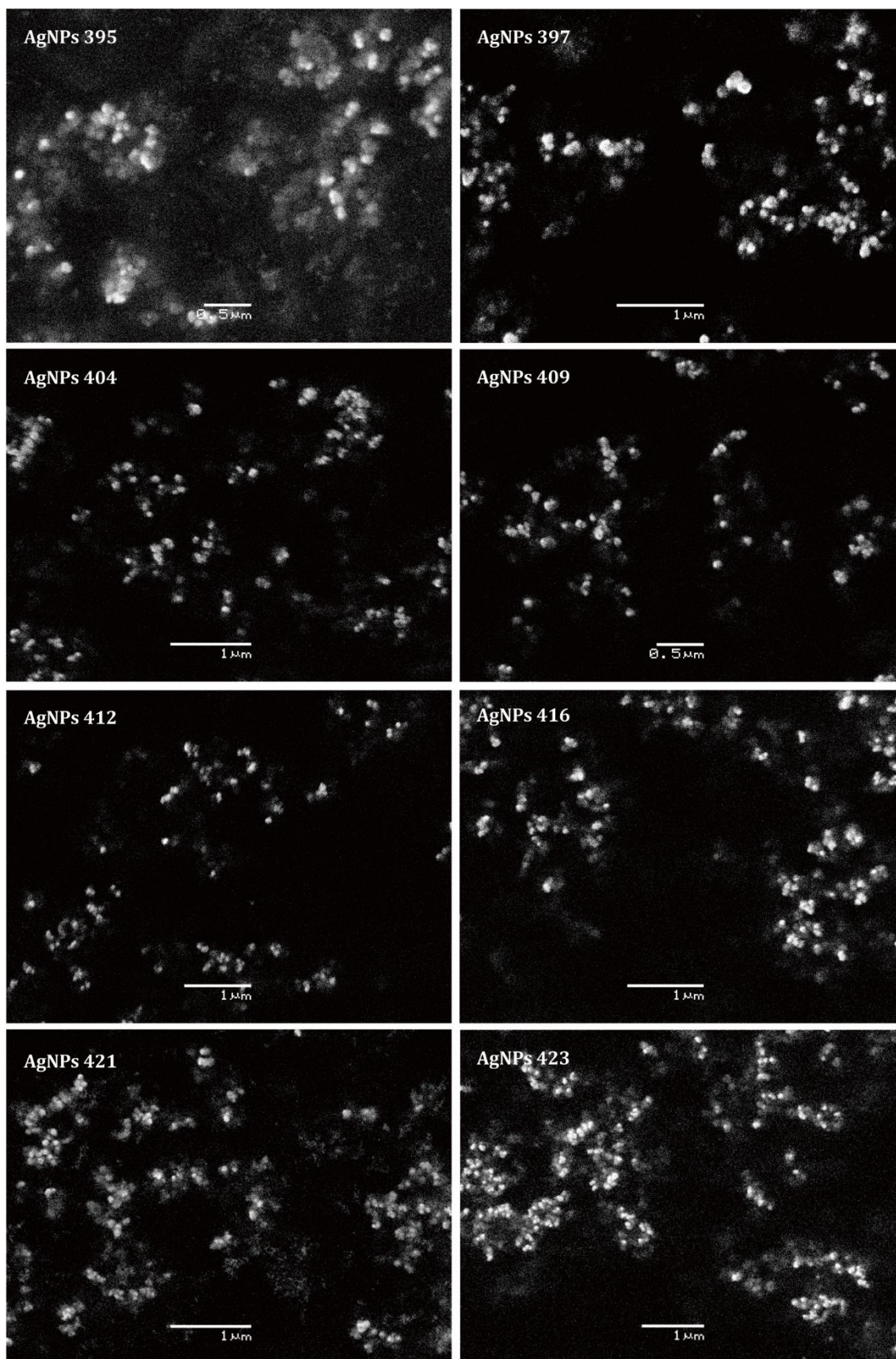


Figura 14. Imágenes de AgNPs obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

3.1.3. Actividad antimicrobiana *in vitro* frente a microorganismos fitopatógenos de plantas de arroz y trigo

Se realizó la determinación de la CIM de las AgNPs sintetizadas en el relevamiento contra *Fusarium graminearum* (patógeno de trigo) y *Pyricularia oryzae* (patógeno de arroz). Para este método estandarizado, se utilizan suspensiones de esporas de hongos filamentosos como inóculo para el cultivo en caldo. Los ensayos fueron realizados evaluando diluciones seriadas de las nanopartículas en caldo, en microplaca de titulación.

La CIM se define como la concentración mínima que provoca una inhibición visible del crecimiento fúngico, por lo que a concentraciones por debajo de la CIM así como en los controles de crecimiento (sin antifúngico), las esporas germinan y se observa el crecimiento del micelio.

Se observó inhibición de crecimiento de *F. graminearum* prácticamente en la totalidad de muestras de AgNPs que fueron estudiadas. Asimismo, es importante resaltar que el rango de concentraciones de inhibición es considerablemente bajo, y se encuentra entre 0.004 y 0.094 nM (**Tabla 2**). En el caso de *Pyricularia oryzae*, los resultados se encuentran en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.070 nM.

Tabla 2. CIM de las AgNPs frente a *Fusarium graminearum* y *Pyricularia oryzae*.

AgNPs *	CIM (nM) <i>F. graminearum</i>	CIM (nM) <i>P. oryzae</i>
395-5	0.034	0.034
397-1	0.032	0.032
397-5	0.004	0.032
404-1	0.035	0.070
404-5	0.070	0.070
404-10	0.018	0.018
409-5	0.054	0.027
409-10	0.027	0.027
412-1	0.026	0.026
412-5	0.021	0.021
412-10	0.013	0.007
416-1	0.066	0.033
416-5	0.037	0.037
421-1	0.094	0.012
421-5	0.014	0.007
421-10	0.011	0.006
423-1	0.022	0.011
423-5	0.070	0.018

*el último dígito corresponde a la concentración de AgNO₃ de la síntesis (1, 5, 10 mM)

Asimismo, se evaluó la actividad antifúngica de los patógenos de arroz *Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*. Para ello, se incorporaron diferentes concentraciones de nanopartículas al medio PDA y se colocó un inóculo vegetativo (disco de micelio fresco) en el centro de la placa de Petri. Luego, se determinó la inhibición del crecimiento del micelio, comparando los diámetros de crecimiento con un control (PDA sin nanopartículas adicionadas) que representa el 100% de crecimiento (**Figura 15**). En este ensayo fueron evaluadas las muestras de AgNPs provenientes de las síntesis realizadas con AgNO₃ 5 mM.

En el caso del ensayo frente a *Rhizoctonia oryzae-sativae*, se observó que las AgNPs de las cepas ILB 395, ILB397 e ILB409 inhibieron el crecimiento del patógeno con un porcentaje de 11%, 39% y 4 %, respectivamente (**Tabla 3**). En el caso de *Sclerotium oryzae*, de los resultados obtenidos se desprende que las AgNPs 395 y 397 a una concentración de 0.14 nM inhiben el crecimiento de *S. oryzae* en igual porcentaje, mientras que AgNPs 409 y AgNPs 416 inhiben en menor porcentaje.

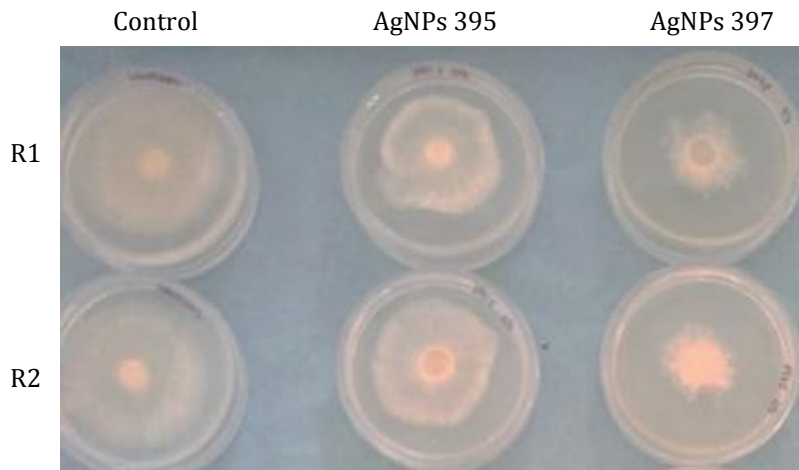


Figura 15. Evaluación de actividad antifúngica en placa de AgNPs 395 y AgNPs 397 frente a *R. oryzae-sativae*.

Tabla 3. Actividad antifúngica de las AgNPs frente a *Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*.

AgNPs	Inhibición (%) <i>R. oryzae-sativae</i>	Inhibición (%) <i>Sclerotium oryzae</i>
395	11 ± 1	19 ± 3
397	39 ± 4	19 ± 7
404	0	0
409	4 ± 2	9 ± 0
412	0	0
416	0	9 ± 0
421	0	0
423	0	0

3.2. Síntesis de nanopartículas metálicas por *Trichoderma harzianum* ILB 395 y *Trichoderma asperellum* ILB 397. Evaluación del efecto en semillas y toxicidad en líneas celulares humanas

Como fuera descrito anteriormente, en el relevamiento de cepas de *Trichoderma* spp. se encontró que todas son capaces de sintetizar AgNPs. A pesar de esto, dos de ellas (ILB 394, ILB 424) lo hicieron con menor eficiencia y por ello fueron descartadas en esta primera instancia. Además, a excepción de las AgNPs sintetizadas por ILB 396, todas fueron estables al proceso de centrifugación.

Asimismo, todas las AgNPs a las que se les estudió la actividad antimicrobiana presentaron actividad antifúngica, siendo tres de ellas (AgNPs 395 397 y 409) activas frente a los cuatro fitopatógenos evaluados.

Las cepas de *Trichoderma* spp. que mostraron mayor capacidad de síntesis de AgNPs y que mostraron actividad antifúngica frente a los 4 fitopatógenos evaluados (*T. harzianum* ILB 395 y *T. asperellum* ILB 397), fueron seleccionadas para los ensayos que se presentan en esta Sección (3.2).

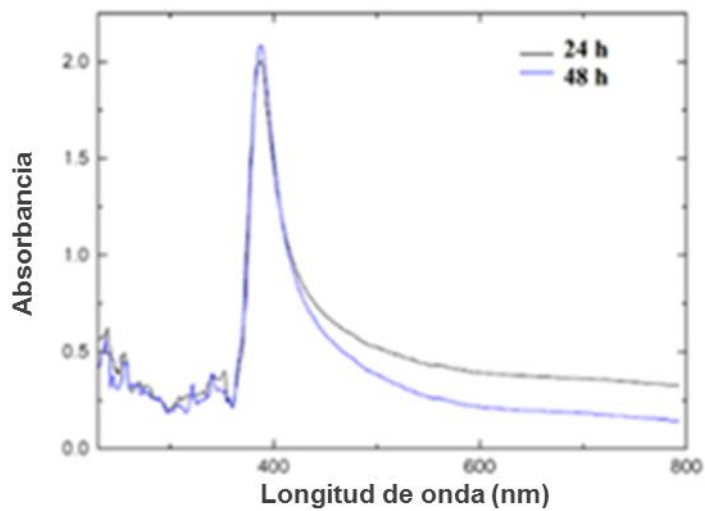
3.2.1. Evaluación de síntesis de nanopartículas de cobre

La síntesis de nanopartículas de cobre por diversos métodos ha sido menos estudiada que las de otras nanopartículas metálicas como oro y plata, obteniéndose según lo reportado en bibliografía nanopartículas de composición y propiedades de mayor variabilidad (Cuevas, et al., 2015; Awwad & Amer, 2020) por lo que resulta relevante y novedoso su estudio. En las condiciones evaluadas (referirse a Sección 2.2.2) únicamente la síntesis realizada con la cepa ILB 395 presentó un pico en el espectro que sugiere la síntesis de nanopartículas de cobre. En la **Figura 16 (a)** se presenta la evolución del pico de absorción a distintos tiempos de reacción. Como puede observarse, la banda correspondiente a la RPS se encuentra en este caso a una longitud de onda de 390 nm, lo que podría atribuirse, según lo reportado en bibliografía (Awwad & Amer, 2020), a nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs).

Además, se estudió el efecto de la variación del pH en la reacción de síntesis, como reportado para nanopartículas de cobre por Cuevas, et al. (2015). Se evaluaron tres condiciones de pH: 5, 7 y 9. En la **Figura 16 (b)** se observan los espectros superpuestos en las distintas condiciones y el pico se corresponde a las CuONPs.

De esta imagen se concluye que a pH=7 la síntesis se vio favorecida (a mayor absorbancia del pico a 390 nm, mayor producción), seguido del pH=9 y del pH=5.

(a)



(b)

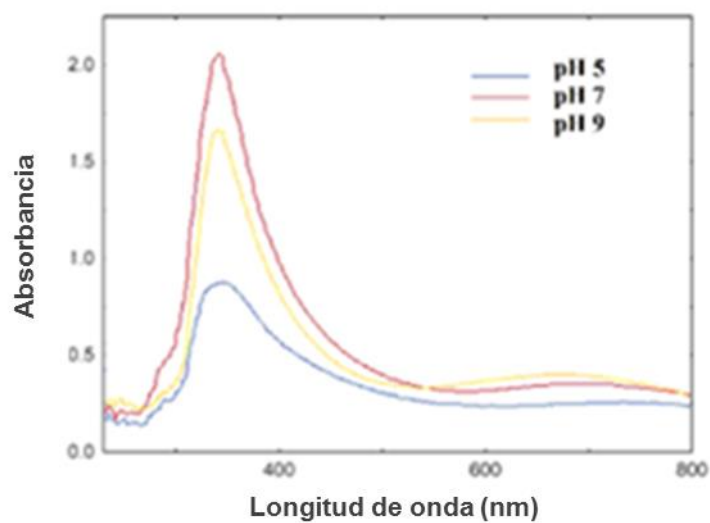


Figura 16. Espectros UV-vis para la síntesis de nanopartículas de cobre **(a)** luego de 24 y 48 h de reacción, **(b)** reacciones a diferentes pH.

3.2.2. Efecto de las nanopartículas en semillas de trigo y arroz

El propósito de la prueba fue determinar si existía un efecto en la germinación de las semillas producto del tratamiento con nanopartículas así como también el efecto en el crecimiento de hongos transmitidos en las semillas.

Para ello, se realizaron ensayos en semilla con las nanopartículas de las cepas que mostraron mejores resultados (ILB 395, ILB 397) en la síntesis con AgNO_3 5 mM.

Con las semillas tratadas se llevaron a cabo dos tipos de ensayo. Uno de ellos consistió en evaluar *in vitro* el efecto del tratamiento con nanopartículas sobre la germinación de semillas en placas. En este caso también se evaluaron las CuONPs provenientes de la cepa ILB 395.

El segundo ensayo consistió en la siembra de las semillas tratadas con AgNPs en macetas en invernáculo.

Los resultados obtenidos se describen a continuación.

3.2.2.1. Ensayo de semillas *in vitro* en placa

Estos ensayos tuvieron como finalidad evaluar el efecto de las nanopartículas sobre la germinación de semillas de trigo y arroz, así como también el crecimiento de microorganismos transmitidos por las semillas y la puesta a punto del diseño experimental.

Efecto de AgNPs 395 y 397 en la germinación de semillas de trigo y arroz

Se utilizaron semillas de trigo y arroz tratadas con AgNPs 395 y 397, y otras tratadas con agua destilada (blanco) y AgNO_3 5 mM. Las semillas de trigo fueron colocadas en placas con medio PDA y las de arroz en placas con agar agua.

Mediante esta metodología se logró observar la evolución de la germinación, así como también el crecimiento de microorganismos presentes en las semillas.

Como puede observarse en los resultados obtenidos (**Figuras 17 y 18**), a los 6 días de incubación no se observaron efectos negativos en la germinación. Las semillas tratadas con nanopartículas se comportaron como el blanco, por lo que no se evidenció un efecto negativo luego del tratamiento. Las semillas tratadas con nitrato de plata mostraron una tendencia a germinar de forma enlentecida con respecto al resto de los tratamientos. Además, AgNO_3 mostró inhibición total del crecimiento microbiano tanto para semillas de trigo y de arroz, mientras que las AgNPs presentaron inhibición parcial en semillas de trigo.

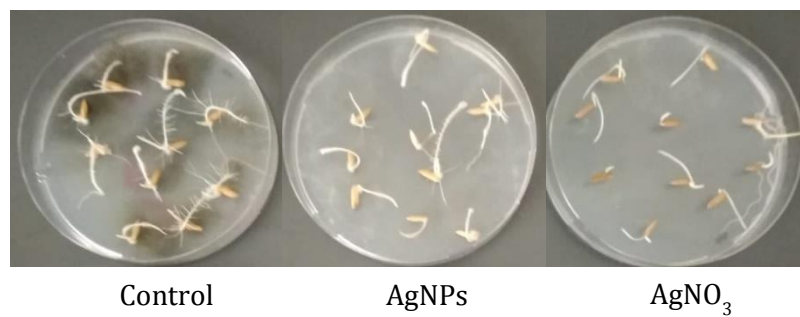
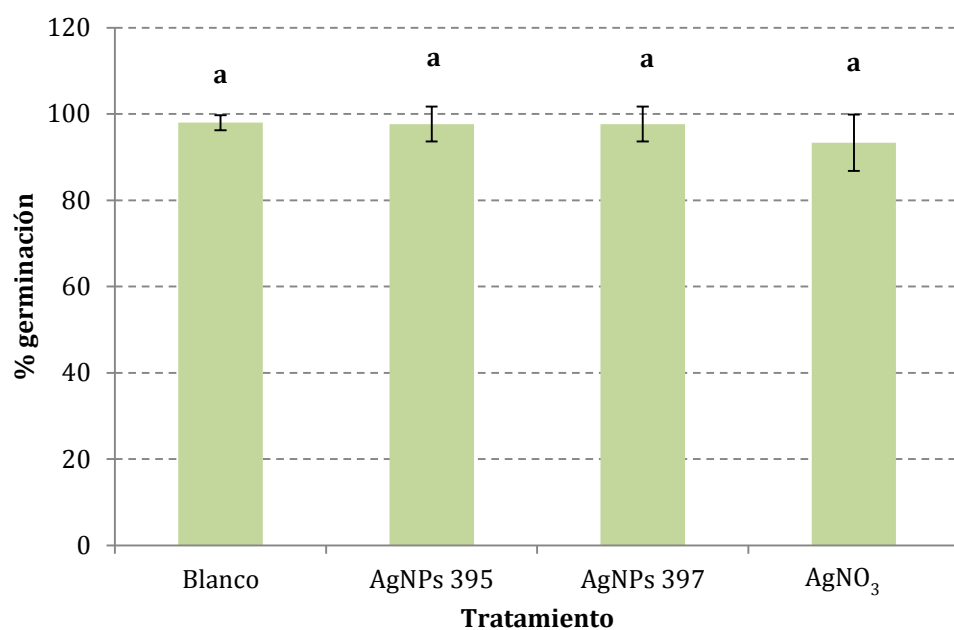


Figura 17. Efecto de las nanopartículas de plata en la germinación de semillas de arroz. Los datos fueron analizados empleando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial (test DGC). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

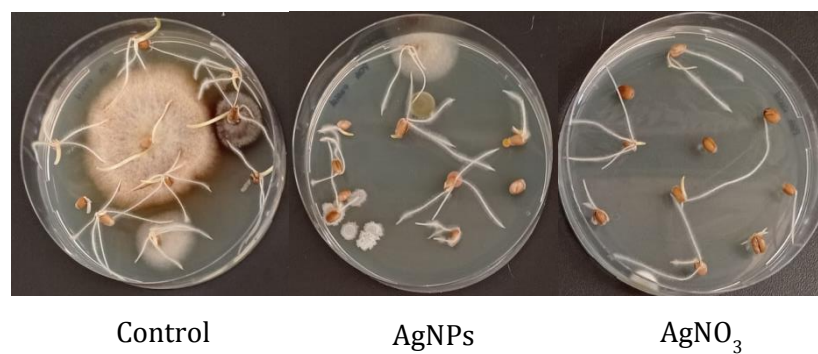
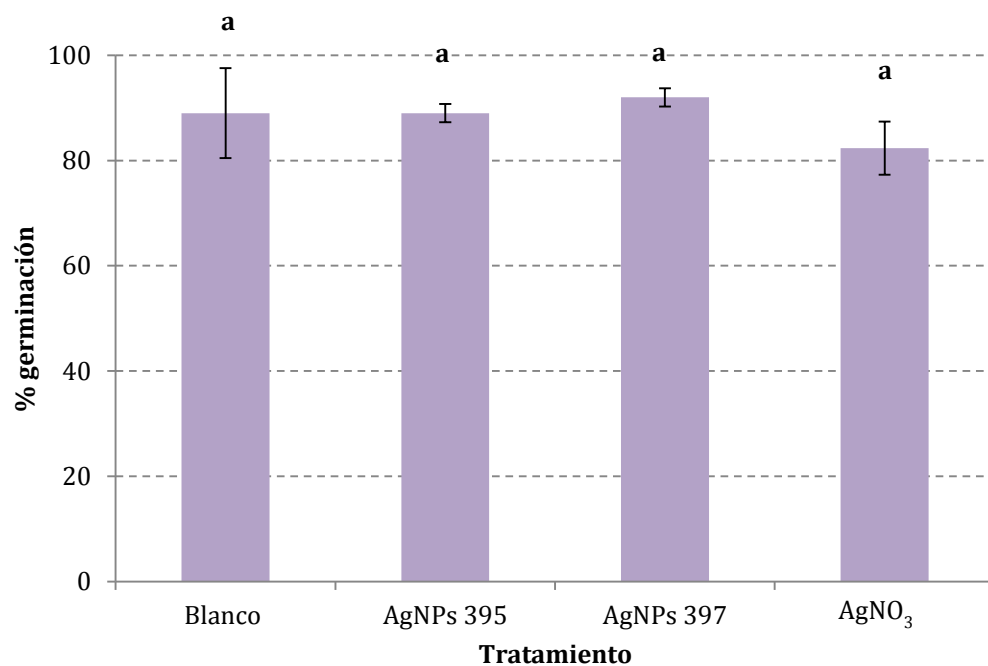


Figura 18. Efecto de las nanopartículas de plata en la germinación de semillas de trigo. Los datos fueron analizados empleando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial (test DGC). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Efecto de las CuONPs 395 en la germinación de semillas de trigo y arroz

De manera similar a lo descrito para el ensayo con AgNPs, también se evaluó el tratamiento de semillas de trigo y arroz con CuONPs (0,2 mM) y CuCl₂ (5 mM). No se observaron diferencias en la germinación y el crecimiento microbiano en comparación con el control (Figuras 19 y 20).

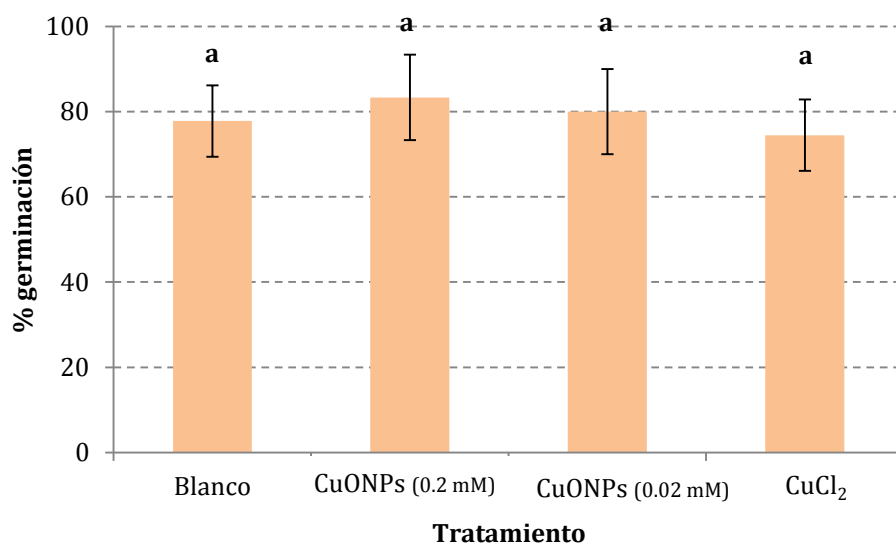


Figura 19. Efecto de las nanopartículas de cobre en la germinación de semillas de trigo. Los datos fueron analizados empleando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial (test DGC). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

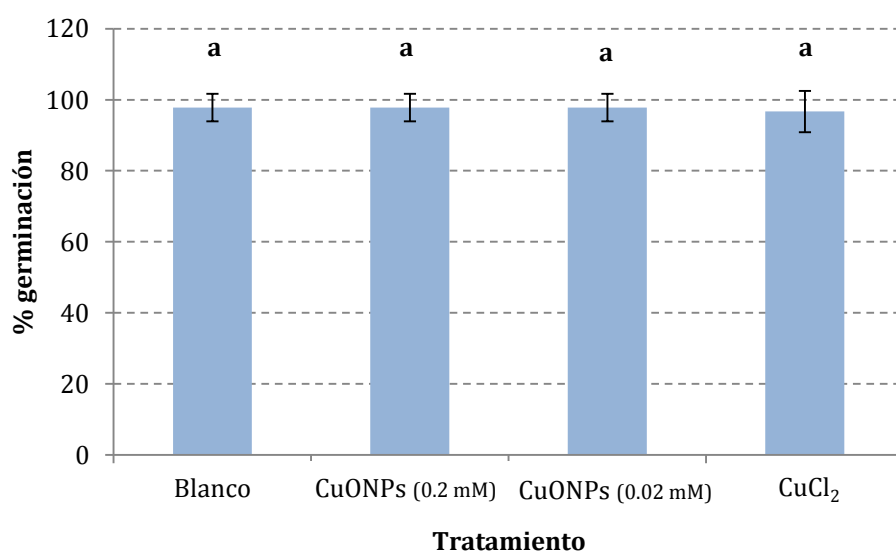


Figura 20. Efecto de las nanopartículas de cobre en la germinación de semillas de arroz. Los datos fueron analizados empleando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial (test DGC). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

3.2.2.2. Ensayo de semillas en maceta

El segundo tipo de ensayo realizado para evaluar el efecto en la germinación de semillas de trigo y arroz, consistió en sembrarlas posterior al tratamiento con las AgNPs 395 y 397, AgNO_3 5 mM y agua destilada (blanco) en una mezcla de tres partes de turba, dos de arena y una de vermiculita. Para cada tratamiento se utilizó un sistema de dos bandejas de 48 celdas cada una. Por lo tanto, se sembraron en total 96 semillas para cada uno de los cuatro tratamientos (**Figura 21**).



Figura 21. Sistema de macetas empleado para el estudio de germinación de plantas de trigo y arroz a partir de semillas tratadas.

Ensayos con semillas de trigo

Como puede observarse en los resultados para semillas de trigo, al comparar la emergencia de plantas a partir de semillas tratadas con las nanopartículas y las semillas blanco, no se encontró un efecto negativo (de toxicidad) de las AgNPs en las semillas. Se nota además una tendencia a una mayor germinación que el blanco para los tratamientos con ambas AgNPs, pero no con AgNO_3 5mM (**Figura 22**). Mediante el software *Infostat* se realizó análisis estadístico utilizando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial y utilizando la función logit. Los tratamientos fueron comparados utilizando el test DGC con un nivel de significancia de 0.05. Se realizó un contraste de los resultados obtenidos para el blanco en las tres réplicas. Al no obtenerse diferencias significativas entre los controles se realizó el contraste de los distintos tratamientos con el blanco, sumando la totalidad de plantas emergidas para cada caso en las repeticiones. De esta forma se confirma que la media de plantas emergidas a partir de semillas tratadas con AgNPs 395 y AgNPs 397 es significativamente diferente (mayor) a la media del blanco sin tratamiento (**Tabla 4**).

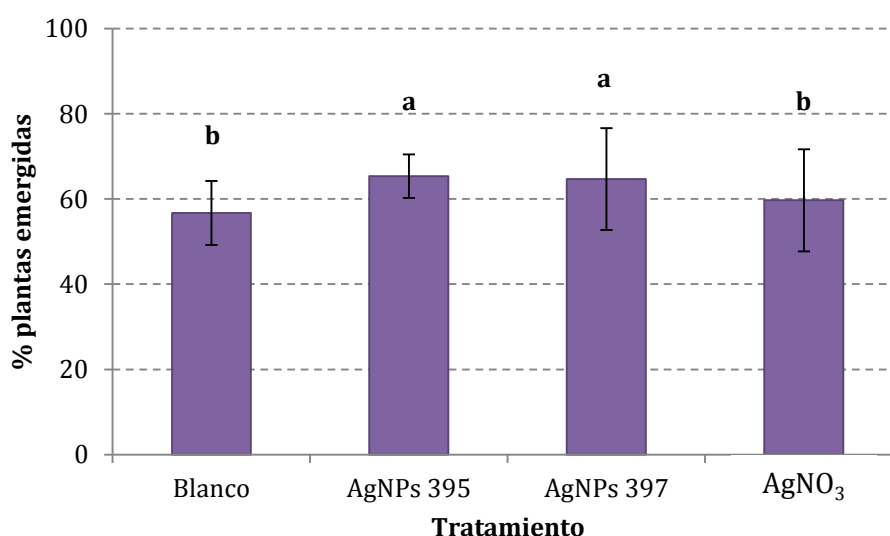


Figura 22. Gráfico de plantas de trigo emergidas a partir de semillas que recibieron distintos tratamientos. Se grafica la media y se representa la desviación estándar de cada tratamiento. Los valores son promedio de tres repeticiones. Los datos fueron analizados empleando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial (test DGC). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 4. Análisis estadístico realizado para el contraste de las muestras de AgNPs (plantas de trigo). Se utilizó el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial; los contrastes fueron realizados mediante test DGC. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Tratamiento	Promedio plantas germinadas por ensayo	Resultado del contraste
Blanco	52	B
AgNPs 395	63	A
AgNPs 397	62	A

Ensayos con semillas de arroz

De igual forma que con las semillas de trigo, no se observó que la germinación se viera afectada negativamente en las semillas de arroz tratadas con nanopartículas (**Figura 23**).

Mediante el análisis estadístico utilizando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial y utilizando la función logit, los tratamientos fueron comparados utilizando el test DGC con un nivel de significancia de 0.05. Se realizó un contraste de los resultados obtenidos para el blanco en las tres réplicas. Al no obtenerse diferencias significativas entre los controles se realizó el contraste de los distintos tratamientos con el blanco, sumando la totalidad de plantas emergidas para cada caso en las repeticiones. De este análisis estadístico se concluye que no hay diferencia entre las medias de plantas emergidas a partir de semillas tratadas con AgNPs 395 y AgNPs 397 si se las compara con el blanco, con una significancia del 5% (**Tabla 5**).

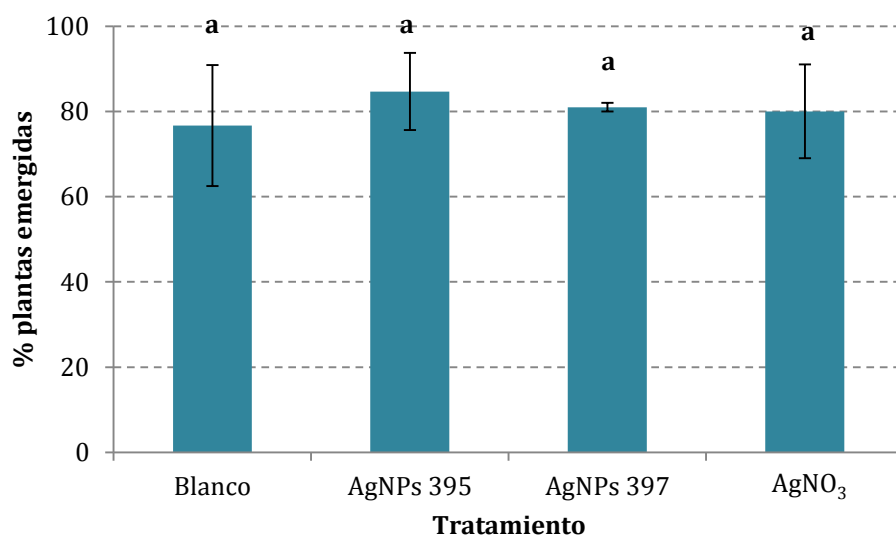


Figura 23. Gráfico de plantas de arroz emergidas a partir de semillas que recibieron distintos tratamientos. Se grafica la media y se representa la desviación estándar de cada tratamiento. Los valores son promedio de tres repeticiones. Los datos fueron analizados empleando el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial (test DGC). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Tabla 5. Análisis estadístico realizado para el contraste de las muestras de AgNPs (plantas de arroz). Se utilizó el Modelo Lineal Generalizado asumiendo distribución binomial; los contrastes fueron realizados mediante test DGC. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Tratamiento	Promedio plantas germinadas por ensayo	Resultado del contraste
Blanco	76	A
AgNPs 395	85	A
AgNPs 397	81	A

3.2.3. Evaluación de la toxicidad en líneas celulares humanas

Como fuera detallado en la Sección 1.1, los nanomateriales, y en particular las nanopartículas biogénicas, poseen propiedades únicas. Es por este motivo que se requiere de una caracterización fisicoquímica apropiada y estudios de toxicidad, teniendo en cuenta su promisorio aplicación como producto biotecnológico.

En el presente trabajo se incluyó una primera evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata biogénicas sintetizadas frente a líneas celulares humanas THP-1. Se determinó la toxicidad de las AgNPs 395 y 397 a diferentes concentraciones luego de 24 horas de exposición de las células evaluadas a las nanopartículas.

En la **Figura 24** se muestran los resultados de toxicidad dosis-dependiente. Para el caso de las AgNPs 395 (**Figura 24 (a)**) la mínima concentración que mostró una disminución en la viabilidad celular fue 35 pM, aunque dicha viabilidad supera el 50% a concentraciones inferiores a 140 pM. En el caso de las AgNPs 397 (**Figura 24 (b)**), si bien el comportamiento fue similar, siendo la mínima concentración que mostró una disminución en la viabilidad celular 50 pM, se observa una caída brusca por debajo del 50% a concentraciones iguales o superiores a 100 pM (**Figura 24 (c)**).

Además, los estudios de toxicidad en células THP-1 mostraron que las concentraciones evaluadas que resultaron ser tóxicas son, en algunos casos, mayores que las necesarias para lograr una inhibición en el crecimiento fúngico, por lo que esta primera aproximación en estudios de citotoxicidad se considera muy promisorio.

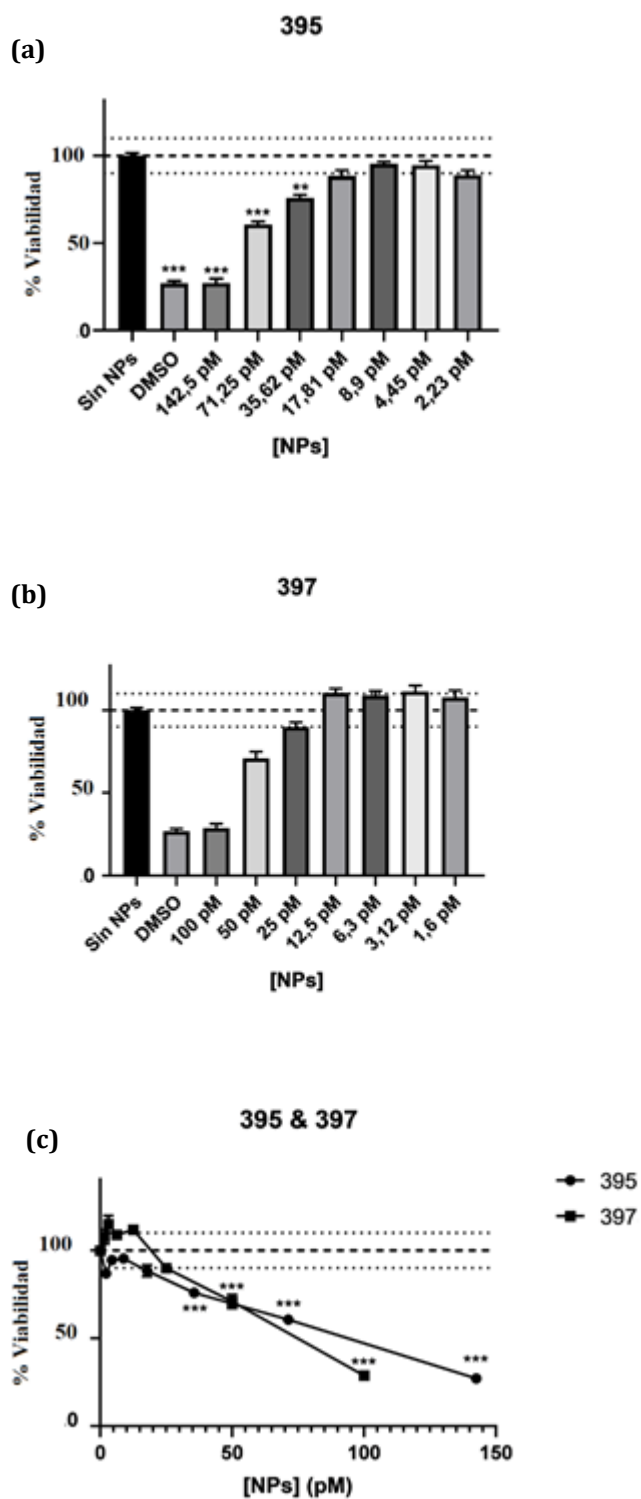


Figura 24. Estudio de toxicidad celular dosis-dependiente de las AgNPs con la línea celular THP-1. En (a) AgNPs de *T. harzianum* ILB 395, (b) AgNPs de *T. asperellum* ILB 397, (c) comparación de ambas. Los resultados se normalizaron respecto a las células sin tratamiento (control) y se realizó un test ANOVA comparando los datos con el control.

3.4. Selección de nanopartículas metálicas de *Trichoderma harzianum* ILB 395: caracterización complementaria, control de fitopatógenos y aplicaciones en campo

En base a los resultados obtenidos y al tiempo previsto para esta tesis de Maestría se decidió seleccionar la cepa de *Trichoderma harzianum* ILB 395 para producir nanopartículas de plata y cobre a mayor escala. Esto permitió profundizar en los diversos aspectos abordados en esta tesis. Por un lado, complementar la caracterización de las nanopartículas biogénicas, lo cual no sólo implica avanzar en el conocimiento en Nanobiotecnología, sino también en su aplicación como antifúngicos frente a hongos fitopatógenos, ya que de sus características dependerán sus propiedades. Por otro lado, lograr el desafío de obtener volumen suficiente de nanopartículas para abordar los primeros ensayos a campo realizados con nanomateriales en Uruguay.

3.4.1. Caracterización complementaria de nanopartículas

3.4.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de transmisión de alta resolución (HR-TEM)-EDS

En primera instancia se realizó SEM, tanto para las AgNPs (como se describió en los resultados del relevamiento, (Sección 3.1.2 del presente Capítulo) como para las CuONPs. En general, se observaron nanopartículas principalmente esféricas en todas las muestras estudiadas, con diámetros promedio inferiores a 90 nm (analizados con el software *Image J*) (**Figuras 25 (a) y (b)**). Luego, se caracterizaron por HR-TEM y EDS tanto las AgNPs como las CuONPs producidas por la cepa *T. harzianum* ILB 395 (**Figuras 25 (c) y 25 (d)**). Como puede observarse en las imágenes obtenidas por HR-TEM, las nanopartículas tienen una forma homogénea y un tamaño pequeño (menos de 10 nm de diámetro). Aunque el análisis SEM mostró tamaños aparentemente más grandes, esta diferencia es esperable y puede explicarse porque el HR-TEM tiene una resolución mucho más alta, por lo que cuando las imágenes se analizan con el software *Image J*, las nanopartículas no se visualizan de la misma manera. Al analizar la imagen desde una resolución más baja, es más difícil definir nanopartículas de forma individual y, por lo tanto, se sobreestiman los diámetros. Por ejemplo, se estimó un diámetro promedio de 80 ± 10 nm para la imagen SEM de las AgNPs, mientras que para la obtenida por HR-TEM 8 ± 3 nm. Lo mismo ocurrió con las CuONPs, obteniendo un

resultado de diámetro promedio de $3,5 \pm 0,5$ nm, considerablemente inferior a lo que se había estimado por las imágenes de SEM. Además, los resultados del análisis elemental de nanopartículas por EDS mostraron Ag y Cu entre los principales componentes elementales de AgNPs y CuONPs, respectivamente (**Figura 25 (c) y (d)**).

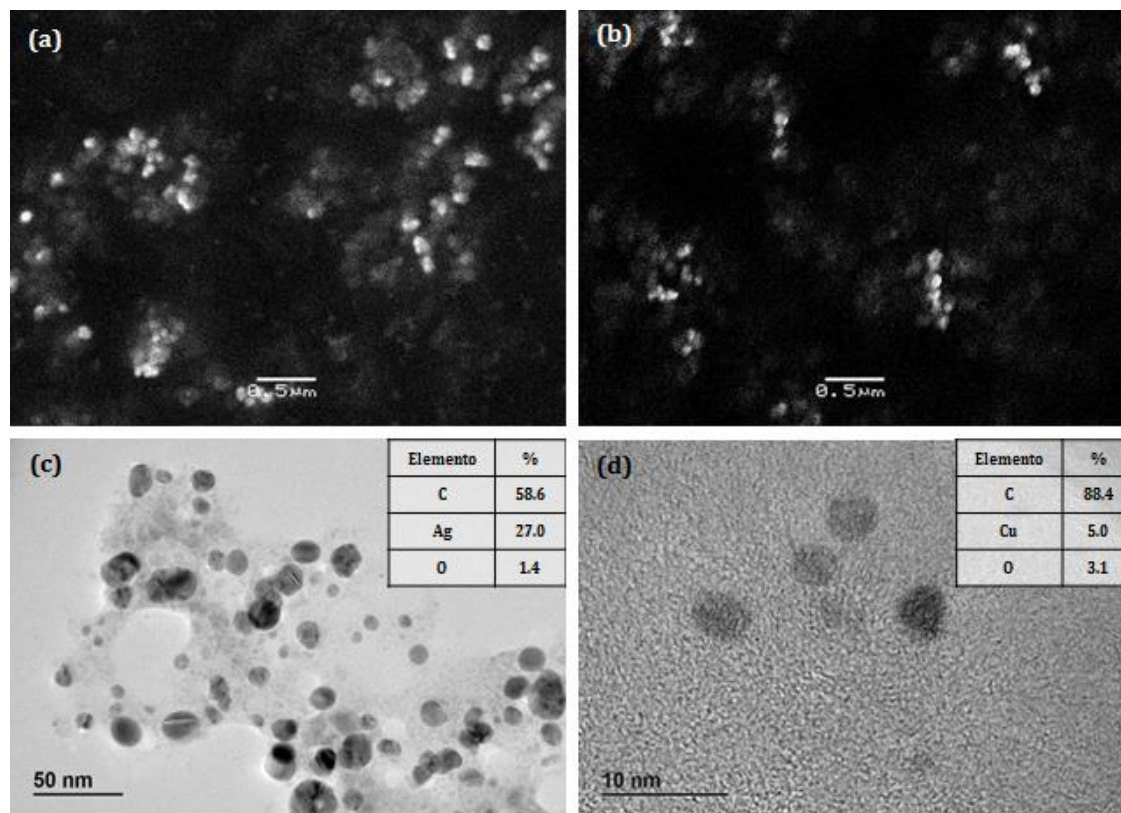


Figura 25. Análisis por **(a)** y **(b)** SEM, **(c)** y **(d)** HR-TEM (EDS) de nanopartículas biogénicas. **(a)** y **(c)** AgNPs; **(b)** y **(d)** CuONPs producidas a partir de la cepa ILB 395.

3.4.1.2. DLS y potencial zeta

La caracterización por DLS permitió determinar los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas. La caracterización del tamaño DLS mostró una única población con un diámetro hidrodinámico de $17,5 \pm 1,1$ nm y un índice de polidispersidad (PDI) de 0,211 en el caso de las AgNPs, así como un diámetro hidrodinámico de $26,4 \pm 2,2$ nm y PDI 0,302 para las CuONPs (**Figura 26 (a) y (b)**). Como puede observarse, los resultados indican una distribución de tamaños ligeramente polidispersa (es decir, con un $PDI < 0.4$).

Las mediciones del potencial zeta mostraron que las AgNPs tenían una carga superficial negativa neta de $-21,5 \pm 6,0$ mV (**Figura 27(a)**). De manera similar, las CuONPs mostraron una carga superficial negativa neta de -13.9 ± 4.9 mV (**Figura 27 (b)**).

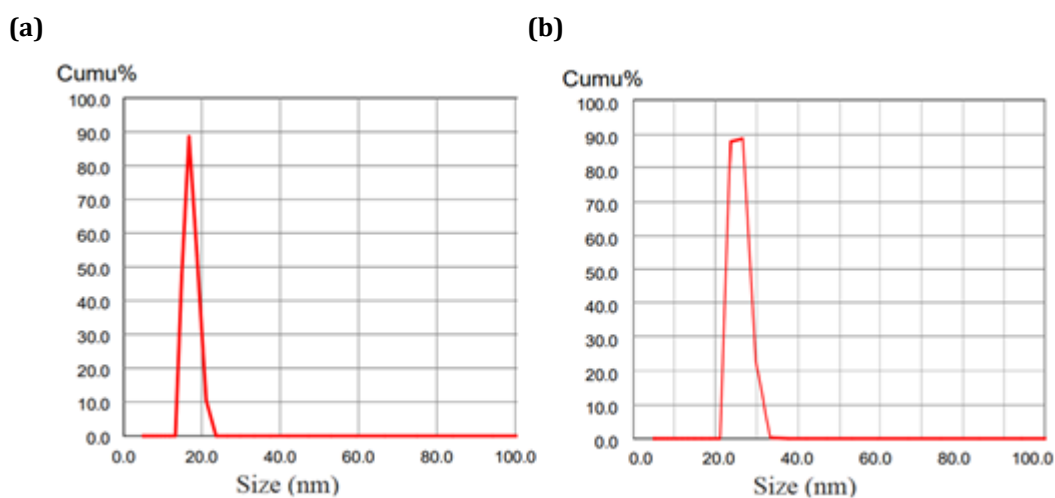


Figura 26. DLS de AgNPs **(a)** y CuONPs **(b)** en solución.

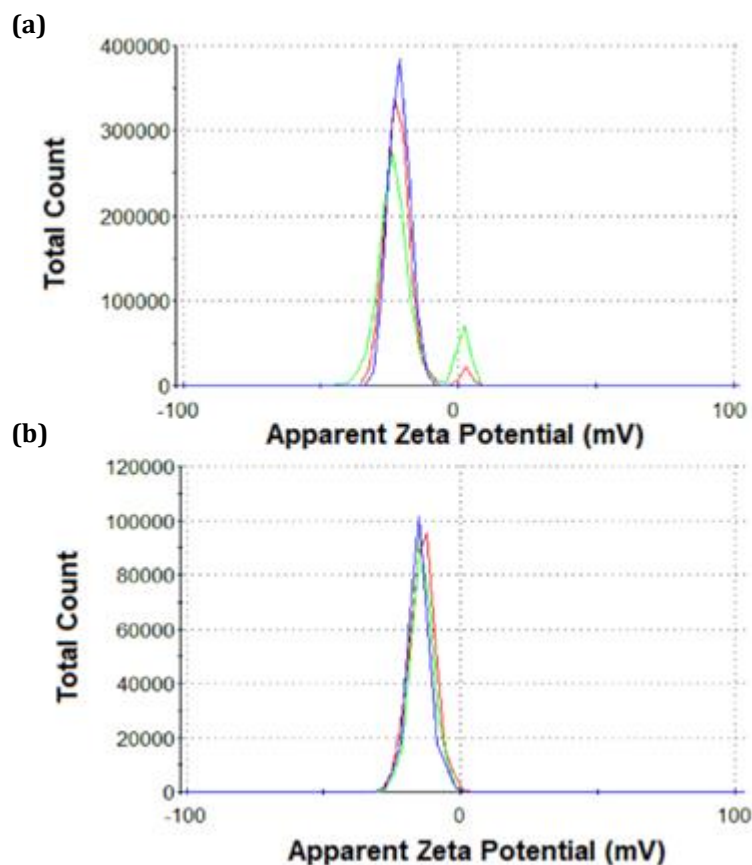


Figura 27. Potencial zeta de AgNPs **(a)** y CuONPs **(b)** en solución.

3.4.1.3. Microscopía Raman Confocal

La microscopía Raman confocal es un tipo de microscopía basada en los modos vibracionales de las moléculas que permite obtener información sobre la naturaleza de los grupos funcionales en las superficies de las nanopartículas (*capping*). Como se muestra en la **Figura 28** correspondiente al espectro Raman de las nanopartículas de plata AgNPs 395, las bandas observadas en la región entre 900 y 1700 cm^{-1} (1042, 1240, 1331, 1360, 1437, 1572 cm^{-1}) pueden atribuirse (según De Gelder, et al., 2007) a la presencia de los aminoácidos l-alanina, l-glutamato y l-prolina, pudiendo estar relacionados con proteínas fúngicas de *T. harzianum* ILB 395. Además, la presencia de la banda a 230 cm^{-1} se puede atribuir al modo de estiramiento de Ag-N, lo que indica que los átomos de nitrógeno del extracto fúngico son parte del recubrimiento de estas nanopartículas (**Figura 28**).

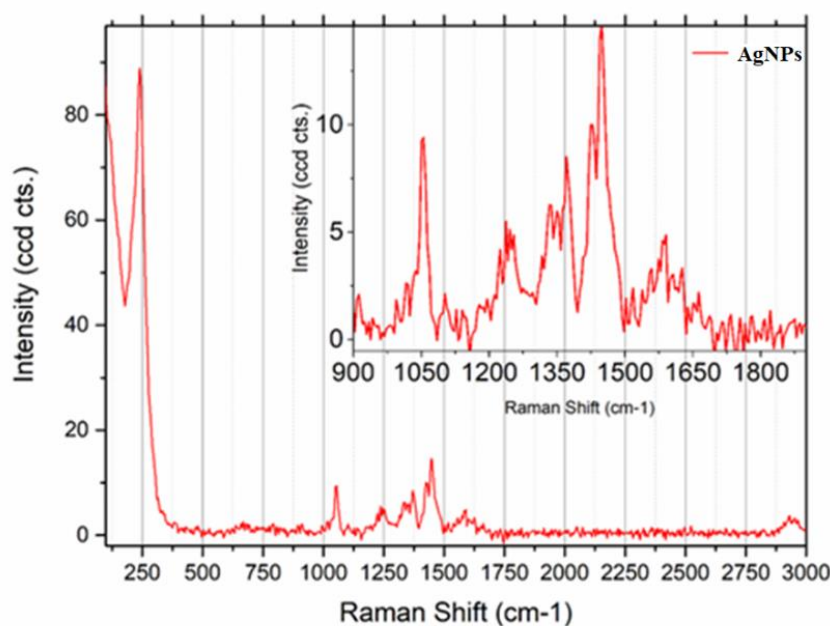


Figura 28. Espectros Raman obtenidos por CRM de AgNPs a 532 nm.

Por otro lado, los resultados de CRM afirman la existencia de nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs). Luego del análisis hiperespectral multivariante, usando *True Components* en *WITec Project 5 Plus* (Dieing & Ibach, 2010) como se puede observar en la **Figura 29** se pudieron distinguir dos regiones principales en la muestra, la Zona 1 y la Zona 2. Estas zonas corresponden a regiones con baja y alta concentración de nanopartículas de óxido de cobre (CuO), ya que los picos asociados a ella podrían confirmarse por las siguientes posiciones de desplazamiento Raman: 282, 325 y 606 cm^{-1} (Muñoz-Escobar & Reyes-López, 2020; Fouda, et al., 2022). En el caso de la región con baja concentración de nanopartículas de CuO, las bandas observadas se ubican principalmente en: 1285, 1362, 1441, 1502, 1580 y 1615 cm^{-1} ; según De Gelder et al. (2007) podrían atribuirse a varios aminoácidos, como: l-valina, l-serina y l-triptófano. Si bien los espectros suelen exhibir similitudes, un examen más detallado revela que las bandas en el rango de 700 a 1800 cm^{-1} sufren alteraciones, incluidos cambios en el número de onda y alteraciones en la intensidad. Estos cambios pueden ser resultado del impacto de la presencia de nanopartículas y sus interacciones de proximidad con la muestra biológica. Además, las nanopartículas metálicas pueden

causar una mejora de la señal, lo que resulta en variaciones de intensidad comparativamente mayores.

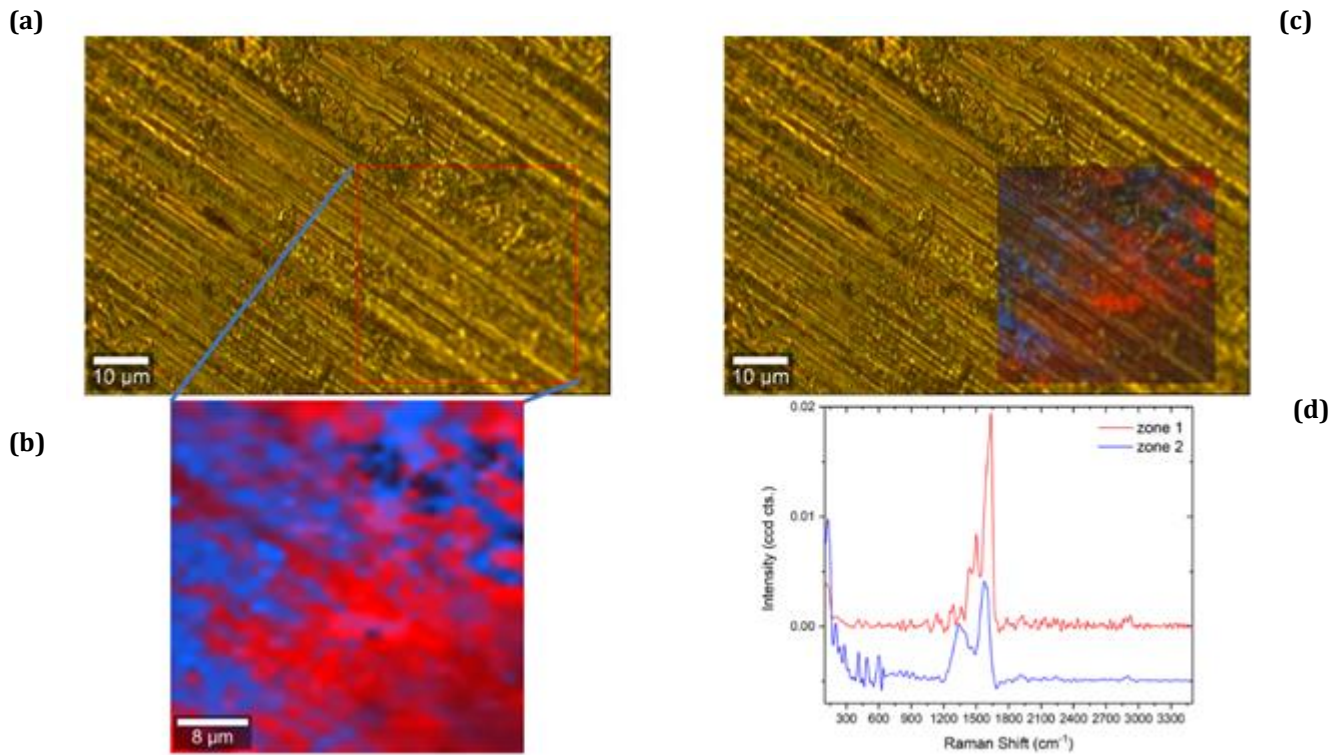


Figura 29. CRM de CuONPs 395. En **(a)** imagen óptica, **(b)** imágenes de CRM indicando regiones de baja y alta concentración de CuONPs (Zona1 y Zona2). En **(c)** superposición de imagen CRM sobre imagen óptica, **(d)** espectros Raman correspondientes a Zona 1 y Zona 2.

3.4.1.4. Actividad antifúngica

Además de profundizar en las caracterizaciones complementarias descritas anteriormente, también se completó el estudio de potencial antifúngico de las nanopartículas metálicas, incluyendo para ello la evaluación de las CuONPs sintetizadas por *T. harzianum* ILB 395. Como resultado, se observó la inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* por ambas nanopartículas metálicas. Asimismo, es importante resaltar que las concentraciones de inhibición de AgNPs y CuONPs fueron menores que las de AgNO₃ y CuCl₂, respectivamente (**Tabla 6**).

También se evaluó la actividad antifúngica de ambas nanopartículas sobre los patógenos del arroz no esporulados *Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*. Las nanopartículas mostraron inhibición del crecimiento micelial (**Tabla 7**). Las AgNPs (0,14 η M) produjeron un 11 % de inhibición de *R. oryzae-sativae* y un 19 % de inhibición de *S. oryzae*. Además, las CuONPs (50 μ M) produjeron un 22 % de inhibición del crecimiento de *R. oryzae* y un 5 % de inhibición de *S. oryzae*. Por el contrario, no se observó inhibición del crecimiento fúngico a concentraciones de AgNO₃ o CuCl₂ inferiores a 0,12 mM.

Tabla 6. CIM contra *F. graminearum* y *P. oryzae*.

	<i>F. graminearum</i>	<i>P. oryzae</i>
AgNPs	34 pM	34 pM
AgNO ₃	78 µM	78 µM
CuONPs	NI	6.3 µM
CuCl ₂	NI	NI

*NI: No inhibe.

Tabla 7. Actividad antifúngica de AgNPs y CuONPs contra *R. oryzae-sativae* y *S. oryzae*.

	% Inhibición	
	<i>R. oryzae-sativae</i>	<i>S. oryzae</i>
AgNPs	11 ± 1	19 ± 3
CuONPs	22 ± 4	5±2

3.4.2 Producción a mayor escala de nanopartículas metálicas de *Trichoderma harzianum* ILB 395

Como se describió en la Sección 2.7, se realizaron tres lotes de síntesis de nanopartículas de plata a partir de *T. harzianum* 395. Luego de la purificación de las nanopartículas se corroboró estabilidad y tamaño mediante espectro UV-vis y medidas de DLS, las cuales presentaron las características descritas durante el relevamiento, demostrando la reproducibilidad del método.

El *pool* obtenido a partir de los lotes alcanzó un volumen de 700 mL y una concentración de 0.56 nM de AgNPs.

Estas muestras fueron suministradas a investigadores de INIA para su aplicación en cultivos de arroz en Treinta y Tres, Uruguay.

Si bien los resultados de estos ensayos a campo no entran dentro de los objetivos de esta tesis de Maestría sí se incluyen como perspectivas de trabajo. En esta primera aproximación de evaluación en campo se realizó una aplicación sobre plantas de arroz (aplicación foliar) por aspersion (Figura 30).



Figura 30. Aspersion de AgNPs 395 sobre un cultivar de arroz de INIA Treinta y Tres.

Capítulo 4.

4.1. Discusión de resultados

4.2. Conclusiones

4.3. Perspectivas

4.1. Discusión de resultados

Las nanopartículas metálicas son consideradas una herramienta novedosa a utilizar para un manejo sostenible de las enfermedades y plagas agrícolas. Además, es de igual relevancia el desarrollo de metodologías de producción que también sean consideradas sostenibles, como la síntesis biológica de nanopartículas que fue desarrollada en esta tesis. Dentro de los mecanismos de síntesis biogénica, se ha sugerido que los hongos podrían ser una opción más apropiada para la producción de nanopartículas a gran escala porque secretan una cantidad significativa de enzimas para las reacciones redox y se obtienen nanopartículas estabilizadas por un *capping* mayormente de naturaleza proteica (Durán, et al., 2023; Fatima & Wahid, 2022). Estudios de posibles mecanismos en la biosíntesis extracelular por hongos muestran que los metabolitos bioactivos producidos serían los responsables de la reducción del metal y se espera que el mismo mecanismo pueda estar involucrado en la reducción tanto de Ag^+ como de Cu^{2+} para la síntesis de nanopartículas (Ovais, et al., 2018). Teniendo en cuenta este aspecto, se sintetizaron nanopartículas de plata a partir de una colección de once cepas de *Trichoderma* spp. y de cobre a partir de *Trichoderma harzianum* ILB 395. La producción de AgNPs y sus usos potenciales en la agricultura han comenzado a ser estudiados y hasta el momento presentan resultados prometedores (Mishra, et al., 2014; Panpatte & Jhala, 2019). Por otro lado, es necesario generar mayor conocimiento sobre la micosíntesis de nanopartículas de cobre para una mejor comprensión de los mecanismos de acción y producción, considerando la potencial aplicación que presentan este tipo de nanopartículas (Ramírez-Valdespino & Orrantia-Borunda, 2021). Debido a que el cobre generalmente se aplica como fungicida en diferentes formas en la agricultura, fue interesante explorar la producción y los usos potenciales de las nanopartículas de cobre además de las de plata biogénicas.

Los espectros UV-vis de las AgNPs biogénicas mostraron bandas cercanas a 250-300 nm que podrían corresponder a diferentes componentes del extracto extracelular de *Trichoderma* spp. (Rai, et al., 2021). Como era de esperar en base a estudios previos (Sanguineto, et al., 2018), el pico correspondiente al RPS de las AgNPs se encontró en el entorno de $\lambda = 440$ nm. Además, se evaluó la síntesis de

nanopartículas de cobre con la cepa *Trichoderma harzianum* ILB 395, con una metodología basada en lo reportado según Cuevas et al. (2015). Este tipo de síntesis ha sido menos estudiada que la de otras nanopartículas metálicas como las de oro y plata. Como se informa en la literatura disponible (Cuevas, et al., 2015; Awwad & Amer, 2020) las nanopartículas de cobre muestran una composición y propiedades de mayor variabilidad. En las condiciones evaluadas, la síntesis realizada con *T. harzianum* ILB 395 mostró una banda en el espectro que sugiere la formación de nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), con un pico RPS que se encuentra en $\lambda = 390$ nm (Awwad & Amer, 2020). Para la síntesis biogénica de nanopartículas de cobre, estudios previos han reportado bandas a diferentes longitudes de onda en el monitoreo UV-vis, atribuyéndolas a nanopartículas de cobre u óxido de cobre. Asimismo, se reportó que el pH podría producir desplazamientos en las bandas obtenidas en el espectro UV-vis de las nanopartículas de cobre (Cuevas, et al., 2015). Teniendo esto en cuenta, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos para la síntesis de nanopartículas de cobre a diferentes pH. Aunque a pH=5 no se observaron cambios en el espectro UV-vis, sí se constató una disminución de la absorbancia a $\lambda = 390$ nm.

Tanto las AgNPs como las CuONPs sintetizadas con extractos de *Trichoderma* spp. fueron purificadas por centrifugación. En este paso se observó que luego del proceso de centrifugación, las AgNPs provenientes de la cepa ILB 396 presentaron un corrimiento del pico de RPS así como una alteración en su forma. Asimismo, se constató macroscópicamente que no era posible resuspender las nanopartículas en agua. Como fue reportado por nuestro grupo (Sanguineto, et al., 2018), las diferencias observadas en la estabilidad de las nanopartículas biogénicas en el proceso de centrifugación podrían atribuirse a las propiedades del *capping* y qué tan fuertemente este se encuentra interaccionando con el *core* de la nanopartícula. Es de importancia lograr obtener las nanopartículas separadas del extracto extracelular en el que fueron sintetizadas sin que su estabilidad se vea afectada, porque de suceder esto consecuentemente también se alterarían sus propiedades y por ende sus aplicaciones (Joseph & Singhvi, 2019).

Se continuó con los estudios de caracterización primaria con aquellas nanopartículas que se mantuvieron estables después del proceso de purificación (**Figura 31**).

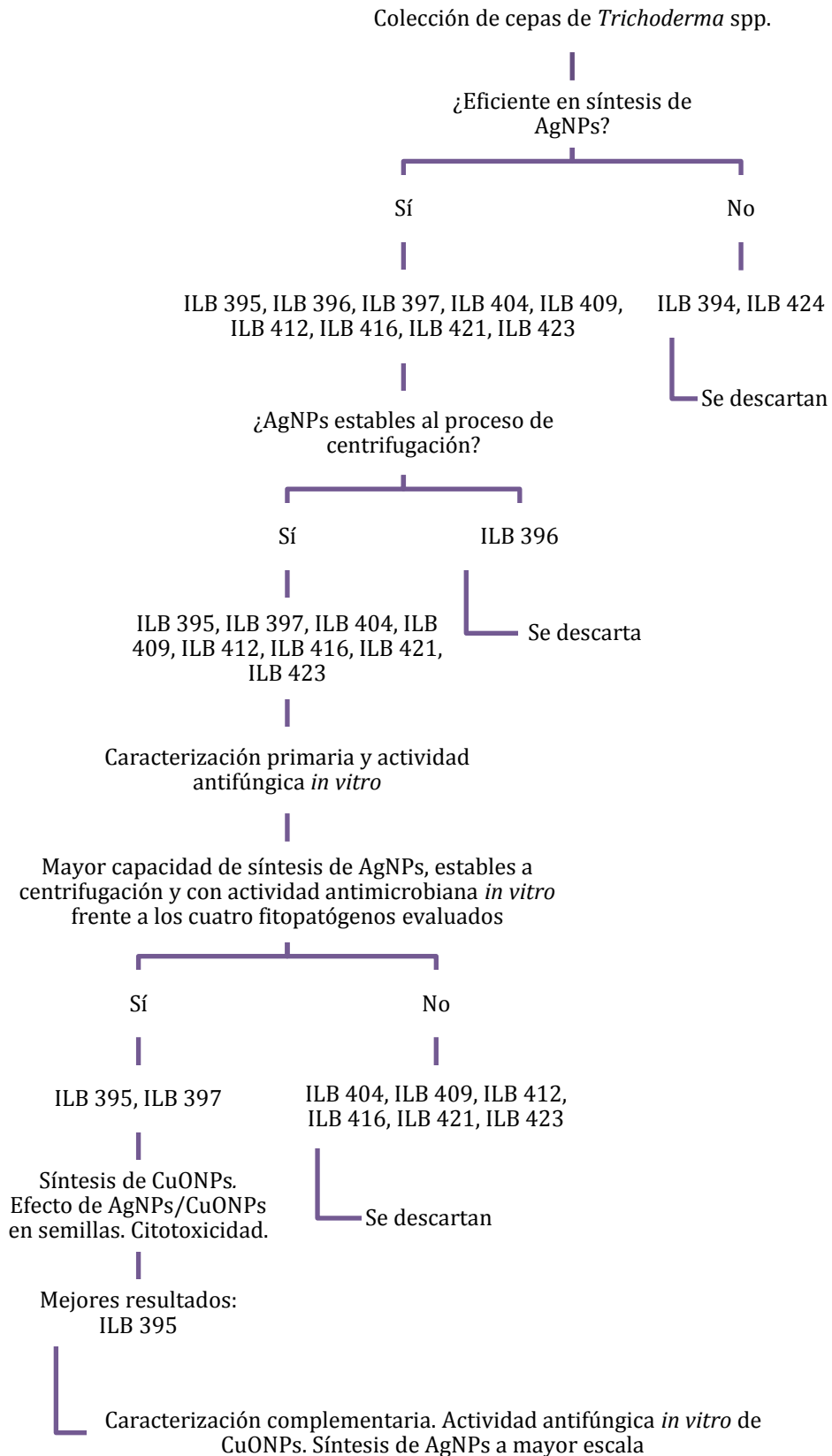


Figura 31. Resumen del proceso de selección de cepas de *Trichoderma* spp. en función de los resultados obtenidos.

Tanto en el caso de las AgNPs como el de las CuONPs, las imágenes de SEM mostraron la presencia de nanopartículas esféricas y tamaño homogéneo. Además, para las nanopartículas de *Trichoderma harzianum* ILB 395 los tamaños fueron determinados mediante el análisis por HR-TEM y DLS. Por HR-TEM el tamaño fue 8 ± 2 nm y $3,5 \pm 0,5$ nm para AgNPs y CuONPs, respectivamente. Por otro lado, la caracterización por DLS mostró un tamaño promedio mayor ($17,5 \pm 1,1$ nm y $26,4 \pm 2,2$ nm). Esta diferencia en los resultados es esperable ya que el DLS mide el diámetro hidrodinámico de las partículas en suspensión, siendo éste mayor a los tamaños que pueden determinarse por TEM (en donde se determina el tamaño del *core* de la nanopartícula metálica). Ambos tipos de nanopartículas mostraron una distribución ligeramente polidispersa ($PDI < 0.4$), consistente con lo reportado previamente para otras nanopartículas biogénicas de hongos (Sanguineto, et al. 2018). Las mediciones del potencial zeta muestran la estabilidad coloidal de las nanopartículas con carga superficial negativa; cuanto más cercano a cero sea el potencial neto de las nanopartículas, mayor es la probabilidad de que formen aglomerados, perdiendo consecuentemente sus propiedades como nanomateriales (Joseph & Singhvi, 2019). Es por ello que se entiende que las fuerzas de repulsión electrostática entre cargas superficiales negativas de las AgNPs o CuONPs juegan un rol importante en su estabilidad.

Los resultados del análisis elemental de nanopartículas por EDS fueron consistentes con las condiciones de síntesis biogénica realizadas, mostrando la plata y el cobre entre los principales componentes químicos elementales. Además, el alto porcentaje de oxígeno presente en las nanopartículas de cobre podría atribuirse no sólo al agente de recubrimiento orgánico de las nanopartículas biogénicas sino también a la probable presencia de nanopartículas de óxido de cobre. Este resultado sería consistente con la banda de RPS obtenida cerca de $\lambda = 390$ nm, como se informó para la síntesis biogénica de nanopartículas de óxido de cobre (Awwad & Amer, 2020). Además, se confirmó la presencia de nanopartículas de óxido de cobre mediante el análisis por CRM. Los datos obtenidos concuerdan con varios estudios espectroscópicos (Raman y FTIR) que confirmaron que el pico de CuONPs estaba en el rango de $400\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ (Muñoz-Escobar & Reyes-López, 2020; Fouda, et al., 2022).

Los grupos funcionales del *capping* de las nanopartículas fueron caracterizados por CRM, indicando que la síntesis biológica produce nanopartículas metálicas coordinadas con átomos de nitrógeno provenientes de las proteínas fúngicas presentes en el extracto extracelular utilizado en la reacción de síntesis. Esto es consistente con las bandas Raman ubicadas en la región de la huella digital entre 900 y 1700 cm^{-1} , que pueden ser atribuidas a la presencia de aminoácidos, sugiriendo que las proteínas del extracto fúngico son parte del recubrimiento de las nanopartículas (Durán, et al., 2023, Estevez, et al., 2020).

Trabajos previos reportaron la síntesis biogénica de nanopartículas de plata utilizando un polvo comercial de *Trichoderma harzianum* (Guilger-Casagrande, et al., 2021). Coincidiendo con este trabajo, la presencia de picos correspondientes a proteínas y residuos de aminoácidos en los espectros UV-vis de nanopartículas biogénicas indica que están involucrados en la formación y estabilización de las nanopartículas. Además, se demostró que el *capping* de las nanopartículas biogénicas cumple un rol fundamental en la actividad biológica que puedan tener, encontrando que las nanopartículas de plata biogénicas recubiertas tenían control en el crecimiento del fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, mientras que esta función se perdía en las nanopartículas biogénicas sin recubrimiento (Guilger-Casagrande, et al., 2021). Además, existen reportes recientes de síntesis de nanopartículas metálicas por *Trichoderma spp.* (Ramírez-Valdespino & Orrantia-Borunda, 2021). Se reportó la síntesis biogénica de nanopartículas de cobre de *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. koningiopsis*. Las nanopartículas de cobre de *T. atroviride* fueron capaces de inhibir los fitopatógenos *Poria hypolateritia* (responsable de la pudrición roja de la raíz) y *Phomopsis theae* (causante de la enfermedad del cancro por *Phomopsis*). Sin embargo, en el relevamiento de cepas realizado en el presente trabajo, las dos cepas de *T. koningiopsis* (ILB 394, ILB 396) fueron descartadas por su baja eficiencia en síntesis de AgNPs y su inestabilidad al proceso de centrifugación.

En esta tesis se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de AgNPs y CuONPs contra patógenos de trigo y arroz, mostrando resultados prometedores. Los valores de CIM fueron inferiores a los de las soluciones de AgNO_3 o CuCl_2 , respectivamente, frente a *Fusarium graminearum* y *Pyricularia oryzae*. Además, se observó

inhibición del crecimiento micelial de *R. oryzae* y *S. oryzae* en medios suplementados con AgNPs y CuONPs. El potencial de las nanopartículas en la actividad antimicrobiana ha llevado a que dentro de sus posibles usos se contemple el control de fitopatógenos, convirtiéndose en candidatos para su uso en la agricultura como una alternativa sostenible al uso de pesticidas de síntesis química comúnmente utilizados para el control de enfermedades (Oluwaseun, 2017). Mishra et al. (2014) sintetizaron nanopartículas de plata biogénicas a partir de bacterias *Serratia* sp. BHU-S4 con actividad antifúngica *in vitro* contra *Bipolaris sorokiana*, responsable de la enfermedad de la mancha foliar en cereales. Estos resultados tuvieron un impacto positivo en el crecimiento de las plantas de trigo cuando se trataron con nanopartículas de plata en un experimento de invernadero.

Las semillas son el medio de producción más básico en la agricultura, la silvicultura y la horticultura. Hoy en día, las prácticas de manejo para fincas comerciales incluyen el tratamiento de semillas con diferentes fungicidas químicos, como prothioconazol y tebuconazol para semillas de arroz en Uruguay (Martínez, 2021). Desafortunadamente, la evolución de la resistencia a los fungicidas se ha convertido en un problema creciente y es importante el monitoreo de la sensibilidad de los fungicidas contra los fitopatógenos así como también el desarrollo de nuevos tratamientos antifúngicos. La posibilidad de ofrecer al productor un tratamiento de aplicación sencilla y utilizando concentraciones menores en comparación con plaguicidas comerciales, es prometedora. Asimismo, que este mismo producto permita aumentar el porcentaje de germinación, la tasa de emergencia de las plantas y la protección contra el estrés biótico, es de suma importancia para fines agrícolas. Para aprovechar los efectos positivos de la inclusión de la nanotecnología en las prácticas agronómicas se debe analizar con profundidad el posible estrés y toxicidad que estas nanopartículas metálicas podrían causar en las plantas y en el ambiente (Spagnoletti, et al., 2019). De acuerdo a los resultados de esta tesis, la aplicación de AgNPs y CuONPs a semillas demostró que las nanopartículas no producen ningún efecto negativo en la germinación de las mismas. Por el contrario, se observó en ensayos en maceta un efecto significativamente positivo en la germinación de plantines de trigo en

comparación con el blanco cuando se trataron las semillas con AgNPs de *T. harzianum* ILB 395 y *T. asperellum* ILB 397.

Por otro lado, se comenzó con estudios de citotoxicidad de las AgNPs en la línea celular humana THP-1. A partir de este ensayo se determinó que las concentraciones a las cuales se comenzó a ver toxicidad de las células eran superiores a las determinadas en los ensayos de actividad antimicrobiana. Aun así, como reporta Guilger et al. (2017), los efectos de toxicidad observados mediante la metodología MTT pueden variar según la línea celular empleada y el tiempo de exposición de las células a las AgNPs biogénicas.

Hasta donde es de conocimiento, el trabajo enmarcado en esta tesis es la primera evaluación de nanopartículas para el control de hongos fitopatógenos de cultivos en Uruguay. Es importante destacar que fue posible la producción de nanopartículas de plata y óxido de cobre a partir de una misma cepa de *T. harzianum*. Aunque la actividad antimicrobiana de las nanopartículas contra fitopatógenos fue reportada previamente (Guilger-Casagrande & Lima, 2019), este es el primer trabajo en el que se logra la síntesis de nanopartículas biogénicas de plata y óxido de cobre de una misma cepa de *T. harzianum* con actividad antifúngica contra *R. oryzae-sativae*, *S. oryzae*, *P. oryzae* y *F. graminearum*, fitopatógenos de interés en nuestro país. Además, la síntesis de las nanopartículas biogénicas fue más rápida y eficiente que lo reportado para otros hongos (Sanguineto, et al., 2018, Durán, et al., 2005).

4.2. Conclusiones

Se sintetizaron nanopartículas de plata a partir de una colección de once cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de cultivos de arroz del Uruguay.

Teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la estabilidad de las AgNPs al proceso de purificación, se continuó con la caracterización primaria y la actividad antimicrobiana con ocho de ellas.

Se seleccionaron *Trichoderma harzianum* ILB 395 y *Trichoderma asperellum* ILB 397, por su eficiencia en la síntesis de AgNPs, para evaluar la síntesis de nanopartículas de cobre. Además, debido a la estabilidad coloidal y su potencial antifúngico, las nanopartículas producidas por ambas cepas fueron utilizadas para realizar ensayos de tratamientos de semillas.

Se evaluaron condiciones de reacción tanto para la síntesis de AgNPs como para la de CuONPs, siendo la concentración de AgNO₃ 5mM y pH 7, respectivamente, donde se obtuvo la mayor síntesis de nanopartículas.

Las caracterizaciones complementarias por UV-vis, SEM, HR-TEM, EDS, DLS, potencial zeta y CRM de las nanopartículas metálicas sintetizadas permitieron obtener información sobre su forma, tamaño, carga y naturaleza del *capping*.

Las nanopartículas biogénicas presentaron actividad antifúngica frente a *R. oryzae-sativae*, *S. oryzae*, *P. oryzae* y *F. graminearum*, demostrando su potencial aplicación en el control de fitopatógenos de interés agrícola en el Uruguay.

Además, los resultados de citotoxicidad realizados con las AgNPs frente a la línea celular humana THP-1 indicaron que las concentraciones de nanopartículas que generaron un efecto de toxicidad en las células expuestas fueron en un valor superior al obtenido por la CIM.

Por último, se estudió la posibilidad de realizar un tratamiento a las semillas de arroz y trigo con AgNPs y CuONPs. Los resultados de estos ensayos fueron positivos, dado que no se observó un efecto negativo en la germinación de las semillas producto del tratamiento. Asimismo, en el caso de las semillas de trigo

tratadas con AgNPs 395 y AgNPs 397 y sembradas en macetas, se observó mayor emergencia de plantines en comparación con el blanco.

4.3. Perspectivas

Se desea continuar con el estudio del mecanismo de reacción involucrado en la síntesis de nanopartículas biogénicas, de modo de optimizar aún más los procesos, especialmente en el caso de las nanopartículas de óxido de cobre.

Adicionalmente, se podrían contemplar variaciones en el proceso de purificación de nanopartículas y así evaluar si es posible lograr obtener AgNPs 396 estables, por ejemplo disminuyendo la velocidad de centrifugación en dicho proceso.

Debido a la gran diversidad de aplicaciones de las nanopartículas biogénicas obtenidas en esta tesis, se podría ahondar en estudios de estabilidad a diferentes condiciones, por ejemplo exposición a distintos pHs o fuerza iónica, así como complementar los estudios de citotoxicidad empleando nuevas líneas celulares o modelos animales.

En cuanto a la potencial aplicación en campo que se busca que tengan las nanopartículas, es de suma relevancia diseñar y llevar a cabo ensayos a campo que permitan evaluar a las nanopartículas y el efecto en el control de fitopatógenos a partir de los promisorios ensayos *in vitro*. Relacionado a esto y de forma general es de gran relevancia contemplar la toxicidad ambiental y el efecto que podría tener la aplicación de nanopartículas directamente en el campo. Para ello es necesario el desarrollo de nuevas líneas de investigación interdisciplinarias que aborden estudios de econanotoxicología incluyendo estudios de caracterización de nanomateriales, impacto en el suelo, en las comunidades microbianas y en otros organismos, etc.

Referencias bibliográficas

- Achari, G. A., & Kowshik, M. (2018). Recent Developments on Nanotechnology in Agriculture: Plant Mineral Nutrition, Health, and Interactions with Soil Microflora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(33), 8647–8661. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00691>
- Ali, J., Waseem, H. (2017). Insight into eco-friendly fabrication of silver nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* and its potential impacts. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(4), 3266–3272. Disponible en: https://www.academia.edu/35434579/Insight_into_eco_friendly_fabrication_of_silver_nanoparticles_by_Pseudomonas_aeruginosa_and_its_potential_impacts
- Alborés, S., Moros, M., Cerdeiras, M. P., de la Fuente, J. M., Grazú, V., & Fraguas, L. F. (2016). A Lectin Purified from Blood Red Bracket Mushroom, *Pycnoporus sanguineus* (Agaricomycetidae), Mycelium Displayed Affinity Toward Bovine Transferrin. *International journal of medicinal mushrooms*, 18(1), 67–74. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i1.80>
- Awwad, A., & Amer, M. (2020). Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Ailanthus altissima* leaf extract and antibacterial activity. *Chemistry International*, 6(4), 210–217.
- Balakumaran, M. D., Ramachandran, R., Balashanmugam, P., Mukeshkumar, D. J., & Kalaichelvan, P. T. (2016). Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiological Research*, 182, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.009>
- Banu, A. N., & Balasubramanian, C. (2014). Optimization and synthesis of silver nanoparticles using *Isaria fumosorosea* against human vector mosquitoes. *Parasitology Research*, 113(10), 3843–3851. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4052-0>
- Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Alizadeh, A., Naghibi, F., & Saravanan, M. (2019). Optimization of myco-synthesized silver nanoparticles by response surface methodology employing Box-Behnken design. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 49(2), 33–43. <https://doi.org/10.1080/24701556.2019.1583251>
- Begum, S. J. P., Pratibha, S., Rawat, J. M., Venugopal, D., Sahu, P., Gowda, A., Qureshi, K. A., & Jaremko, M. (2022). Recent Advances in Green Synthesis, Characterization, and Applications of Bioactive Metallic Nanoparticles. *Pharmaceuticals*, 15(4), 455. <https://doi.org/10.3390/ph15040455>
- Boca-Farcau, S., Potara, M., Simon, T., Juhem, A., Baldeck, P., & Astilean, S. (2014). Folic acid-conjugated, SERS-labeled silver nanotriangles for multimodal detection and targeted photothermal treatment on human ovarian cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*, 11(2), 391–399. <https://doi.org/10.1021/mp400300m>

- Botasini, S., & Méndez, E. (2013). Silver nanoparticle aggregation not triggered by an ionic strength mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4), 1526. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1526-4>
- Cao, W., Huang, T., Xu, X. H. N., & Elsayed-Ali, H. E. (2011). Localized surface plasmon resonance of single silver nanoparticles studied by dark-field optical microscopy and spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, 109(3). <https://doi.org/10.1063/1.3544349>
- Chan, Y. S., & Don, M. M. (2013). Optimization of process variables for the synthesis of silver nanoparticles by *Pycnopus sanguineus* using statistical experimental design. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(1), 11–20. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2177-3>
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard, 3th Edition 2017, CLSI.
- Cuevas, R., Durán, N., Diez, M. C., Tortella, G. R., & Rubilar, O. (2015). Extracellular Biosynthesis of Copper and Copper Oxide Nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a Native White-Rot Fungus from Chilean Forests. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/789089>
- De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenabeele, P., & Moens, L. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(9), 1133–1147. <https://doi.org/10.1002/jrs.1734>
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., & Verma, M. (2012). Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: Current trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(1), 49–73. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.550568>
- Dieing, T., & Ibach, W. (2010). *Software Requirements and Data Analysis in Confocal Raman Microscopy*, 61–89. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12522-5_4
- Di Rienzo, J. A., Guzman, A. W., & Casanoves, F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 7(2), 129–142. <https://doi.org/10.1198/10857110260141193>
- Durán, N., Fávoro, W., Alborés, S., da Costa, T., & Tasic, L. (2023). Biogenic Silver Nanoparticles Capped with Proteins: Timed Knowledge and Perspectives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230062>
- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., De Souza, G. I., & Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-8>
- Escalante, F., Bao, L. y Martínez Kopp, S. (2018). *Manual de identificación de enfermedades y plagas en el cultivo de arroz*. Montevideo, Uruguay: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Disponible en: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacionAINFO-58001.aspx>

- Esmail, R., Afshar, A., Morteza, M., Abolfazl, A., & Akhondi, E. (2022). Synthesis of silver nanoparticles with high efficiency and stability by culture supernatant of *Bacillus* ROM6 isolated from Zarshouran gold mine and evaluating its antibacterial effects. *BMC Microbiology*, 22(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02490-5>
- Estevez, M. B., Casaux, M. L., Fraga, M., Faccio, R., & Alborés, S. (2021). Biogenic Silver Nanoparticles as a Strategy in the Fight Against Multi-Resistant *Salmonella enterica* Isolated From Dairy Calves. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.644014>
- Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., & Alborés, S. (2020). Biofilm Eradication Using Biogenic Silver Nanoparticles. *Molecules*, 25(9), 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules25092023>
- Estevez, M. B., Mitchell, S. G., Faccio, R., & Alborés, S. (2019). Biogenic silver nanoparticles: understanding the antimicrobial mechanism using Confocal Raman Microscopy. *Materials Research Express*, 6(12), 1250f5. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6636>
- Fatima, F., & Wahid, I. (2022). Eco-friendly synthesis of silver and copper nanoparticles by *Shizophyllum commune* fungus and its biomedical applications. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(8), 7915–7926. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03517-6>
- Fouda, A., Hassan, S., Eid, A., Awad, M., Althumayri, K., Badr, N. & Hamza, M. (2022). Endophytic bacterial strain, *Brevibacillus brevis*-mediated green synthesis of copper oxide nanoparticles, characterization, antifungal, in vitro cytotoxicity, and larvicidal activity. *Green Processing Synthesis*, 11(1): 931-950. <https://doi.org/10.1515/gps-2022-0080>
- Garg, D., Sarkar, A., Chand, P., Bansal, P., Gola, D., Sharma, S., Khantwal, S., Surabhi, Mehrotra, R., Chauhan, N., & Bharti, R. K. (2020). Synthesis of silver nanoparticles utilizing various biological systems: mechanisms and applications—a review. *Progress in Biomaterials*, 9(3), 81–95. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00135-2>
- Gharpure, R., Hunter, C.M., Schnall, A.H., Barrett, C.E., Kirby, A.E., Kunz, J., Berling, K., Mercante, J.W., Murphy, J.L. & Garcia-Williams, A.G. (2020). Conocimientos y prácticas sobre limpieza y desinfección seguras del hogar para la prevención de la COVID-19 – Estados Unidos, mayo de 2020 MMWR 69 23 705 -709 Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6923e2.htm>
- Gonzalez Moreno, M., Wang, L., De Masi, M., Winkler, T., Trampuz, A., & Di Luca, M. (2019). In vitro antimicrobial activity against *Abiotrophia defectiva* and *Granulicatella elegans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(8), 2261–2268. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz174>
- Gopinath, V., Priyadarshini, S., Mun Fai Loke, Arunkumar, J., Marsili, E., MubarakAli, D., Velusamy, P., Vadivelu, J. (2017). Biogenic synthesis, characterization of antibacterial silver nanoparticles and its cell cytotoxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(8), 1107-1117. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.011>.

- Guerra, F., Attia, M., Whitehead, D., & Alexis, F. (2018). Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules*, 23(7), 1760. <https://doi.org/10.3390/molecules23071760>
- Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Bilesky-José, N., Pasquoto-Stigliani, T., Carvalho, L., Fraceto, L. F., & de Lima, R. (2021). Influence of the capping of biogenic silver nanoparticles on their toxicity and mechanism of action towards *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00797-5>
- Guilger-Casagrande, M., & Lima, R. de. (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00287>
- Guilger, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N., Grillo, R., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F., & Lima, R. de. (2017). Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Scientific Reports*, 7(1), 44421. <https://doi.org/10.1038/srep44421>
- Gurunathan, S., Raman, J., Abd Malek, S. N., John, P. A., & Vikineswary, S. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4399-4413.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. d., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W., Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499-511.
- Hamouda, R. A., Hussein, M. H., Abo-elmagd, R. A., & Bawazir, S. S. (2019). Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Scientific Reports*, 9(1), 13071. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49444-y>
- Ibrahim, S., Ahmad, Z., Manzoor, M. Z., Mujahid, M., Faheem, Z., & Adnan, A. (2021). Optimization for biogenic microbial synthesis of silver nanoparticles through response surface methodology, characterization, their antimicrobial, antioxidant, and catalytic potential. *Scientific Reports*, 11(1), 770. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80805-0>
- Joseph, E., & Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* (pp. 91–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2>
- Kah, M., Tufenkji, N. and White, J.C. (2019). Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nature nanotechnology*, 14(6), 532–540. <https://doi.org/10.1038/S41565-019-0439-5>.
- Khan, S., Singh, S., Gaikwad, S., Nawani, N., Junnarkar, M., & Pawar, S. V. (2020). Optimization of process parameters for the synthesis of silver nanoparticles from

- Piper betle leaf aqueous extract, and evaluation of their antiphytofungus activity. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 27221–27233. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05239-2>
- Khodashenas, B & Ghorbani, H. (2014). Synthesis of Copper Nanoparticles : An Overview of the Various Methods. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31, 1105-1109. <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0127-y>
- Kora, A. J., Sashidhar, R. B., & Arunachalam, J. (2010). Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A template for the green synthesis and stabilization of silver nanoparticles with antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 670–679. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.034>
- Korbekandi, H., Ashari, Z., Iravani, S., & Abbasi, S. (2013). Optimization of Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 12(3), 289–298
- La Torre, A., Iovino, V., Caradonia, F. (2018). Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(2), 201–236. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-23407
- Lahuta, L. B., Szablińska-Piernik, J., Głowacka, K., Stałanowska, K., Railean-Plugaru, V., Horbowicz, M., Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2022). The Effect of Bio-Synthesized Silver Nanoparticles on Germination, Early Seedling Development, and Metabolome of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecules*, 27(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072303>
- Lamichhane, J.R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J.B., Aubertot, J-N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy of Sustainable Development*, 38(28). <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- Liu, Y., Wang, G., Li, C., Zhou, Q., Wang, M., & Yang, L. (2014). A novel acetylcholinesterase biosensor based on carboxylic graphene coated with silver nanoparticles for pesticide detection. *Materials Science and Engineering C*, 35(1), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.10.036>
- Martínez, S. (2021). Stem rot management by nitrogen and potassium fertilization and effect on grain yield and quality of rice in Uruguay. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(6), 783–793. <https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1922939>
- Mishra, S., Singh, B. R., Singh, A., Keswani, C., Naqvi, A. H., & Singh, H. B. (2014). Biofabricated Silver Nanoparticles Act as a Strong Fungicide against *Bipolaris sorokiniana* Causing Spot Blotch Disease in Wheat. *PLoS ONE*, 9(5), e97881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097881>
- Mohammed, S. R., Zeitar, E. M., & Eskov, I. D. (2019). Inhibition of Mycelial Growth of *Rhizoctonia Solani* by Chitosan in vitro and in vivo. *The Open Agriculture Journal*, 13(1), 156–161. <https://doi.org/10.2174/1874331501913010156>

- Mombrú, A. /2013). Nanotecnología y Uruguay. Capítulo 1. En: Las nanotecnologías en Uruguay. 1era Edición Colección Interdisciplinarias 2012. ISBN del volumen 978-9974-0-0961-5. Disponible en <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/7583/1/nanotecnolog%C3%ADas.pdf>
- Muñoz-Escobar, A., & Reyes-López, S. Y. (2020). Antifungal susceptibility of *Candida* species to copper oxide nanoparticles on polycaprolactone fibers (PCL-CuONPs). *PLOS ONE*, 15(2), e0228864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228864>
- Nagaprasad, N., Chandralekha, D., Karri, V. V. S. R., Shanmugam, R., Dwarampudi, L. P., Tesfaye, J. L., & Krishnaraj, R. (2022). Synchronous and Futuristic Views on the Application of Silver Nanoparticles: A Journey towards Green Synthesis. *Journal of Nanomaterials*, 2022, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2022/7411352>
- Nandini, B., Hariprasad, P., Prakash, H. S., Shetty, H. S., & Geetha, N. (2017). Trichogenic-selenium nanoparticles enhance disease suppressive ability of *Trichoderma* against downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola* in pearl millet. *Scientific Reports*, 7(1), 2612. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02737-6>
- Navarro Gallón, S. M., Alpaslan, E., Wang, M., Larese-Casanova, P., Londoño, M. E., Atehortúa, L., Pavón, J. J., & Webster, T. J. (2019). Characterization and study of the antibacterial mechanisms of silver nanoparticles prepared with microalgal exopolysaccharides. *Materials Science and Engineering: C*, 99, 685–695. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.134>
- Oluwaseun, A. C. (2017). Impacts of Biogenic Nanoparticle on the Biological Control of Plant Pathogens. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, 7(3). <https://doi.org/10.19080/aibm.2017.07.555711>
- Otoni, C. A., Simões, M. F., Fernandes, S., dos Santos, J. G., da Silva, E. S., de Souza, R. F. B., & Maiorano, A. E. (2017). Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express*, 7(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>
- Ovais, M., Khalil, A., Ayaz, M., Ahmad, I., Nethi, S., & Mukherjee, S. (2018). Biosynthesis of Metal Nanoparticles via Microbial Enzymes: A Mechanistic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4100. <https://doi.org/10.3390/ijms19124100>
- Panpatte, D. G., & Jhala, Y. K. (2019). Nanotechnology for agriculture: Advances for sustainable agriculture. In *Nanotechnology for Agriculture: Advances for Sustainable Agriculture*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9370-0>
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., & Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *The Analyst*, 139(19), 4855. <https://doi.org/10.1039/C4AN00978A>

- Parisi, C., Vigani, M., & Rodríguez-Cerezo, E. (2015). Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today*, 10(2), 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.09.009>
- Pereyra, S. A., Vero, S., & Dill-Macky, R. (2005). *Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada Managing leaf blotches in barley View project*. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/277852805>
- Pestovsky, Y. S., & Martínez-Antonio, A. (2017). The Use of Nanoparticles and Nanoformulations in Agriculture. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(12), 8699–8730. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.15041>
- Prabhu, S., & Poulose, E. K. (2012). *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. <http://www.inl-journal.com/content/2/1/32>
- Prema, P., Subha Ranjani, S., Ramesh Kumar, K., Veeramanikandan, V., Mathiyazhagan, N., Nguyen, Van-Huy & Blaji, P. (2022). Microbial synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* for antioxidant, antibacterial activities. *Inorganic Chemistry Communications*, 136. <http://10.0.3.248/j.inoche.2021.109139>
- Quinteros, M. A., Bonilla, J. O., Alborés, S. V., Villegas, L. B., & Páez, P. L. (2019). Biogenic nanoparticles: Synthesis, stability and biocompatibility mediated by proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184, 110517. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110517>
- Quinteros, M. A., Cano Aristizábal, V., Dalmasso, P. R., Paraje, M. G., & Páez, P. L. (2016). Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro*, 36, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007>
- Rai, M., Bonde, S., Golinska, P., Trzcińska-Wencel, J., Gade, A., Abd-Elsalam, K. A., Shende, S., Gaikwad, S., & Ingle, A. P. (2021). Fusarium as a Novel Fungus for the Synthesis of Nanoparticles: Mechanism and Applications. *Journal of Fungi*, 7(2), 139. <https://doi.org/10.3390/jof7020139>
- Ramírez-Valdespino, C. A., & Orrantia-Borunda, E. (2021). Trichoderma and Nanotechnology in Sustainable Agriculture: A Review. *Frontiers in Fungal Biology*, 2. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.764675>
- Rodrigues, A. G., Ping, L. Y., Marcato, P. D., Alves, O. L., Silva, M. C. P., Ruiz, R. C., Melo, I. S., Tasic, L., & De Souza, A. O. (2013). Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 775–782. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4209-7>
- Rose, G. K., Soni, R., Rishi, P., & Soni, S. K. (2019). Optimization of the biological synthesis of silver nanoparticles using *Penicillium oxalicum* GRS-1 and their antimicrobial effects against common food-borne pathogens. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 144–156. <https://doi.org/10.1515/gps-2018-0042>

- Sabaratnam, V., Gurunathan, S., Raman, J., Abd Malek, S. N., & John, P. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 4399. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51881>
- Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., & Fauzi, M. B. (2020). The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. *Nanomaterials*, 10(8), 1566. <https://doi.org/10.3390/nano10081566>
- Sanguiñedo, P., Estevez, M. B., Faccio, R., & Alborés, S. (2019). Nanopartículas de plata biogénicas a partir del hongo *Punctularia atropurpurascens* para el control de microorganismos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 12(22), 1. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.22.67627>
- Sanguiñedo, P. (2018). *Biosíntesis, caracterización y evaluación de actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata a partir del extracto extracelular de Punctularia atropurpurascens*. Tesina de Grado. Facultad de Química, UDELAR.
- Sanguiñedo, P., Fratila, R. M., Estevez, M. B., Fuente, J. M. de la, Grazú, V., & Alborés, and S. (2018). Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi and Their Antibacterial Activity. *Nano Biomedicine and Engineering*, 10(2). <https://doi.org/10.5101/nbe.v10i2.p165-173>
- Shanthi, S., David Jayaseelan, B., Velusamy, P., Vijayakumar, S., Chih, C. T., & Vaseeharan, B. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dabb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microbial Pathogenesis*, 93, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.014>
- Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S. Z., Kaleem, A., Abdullah, R., Sharif, S., Naz, S., Saleem, F., Aihetasham, A. & Chaudhary, A. (2019). Size-Controlled Production of Silver Nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: Likely Antibacterial and Cytotoxic Effects. *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>
- Sivera, M., Kvitek, L., Soukupova, J., Panacek, A., Pucek, R., Vecerova, R., & Zboril, R. (2014). Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity. *PloS One*, 9(8), e103675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103675>
- Spagnoletti, F. N., Spedalieri, C., Kronberg, F., & Giacometti, R. (2019). Extracellular biosynthesis of bactericidal Ag/AgCl nanoparticles for crop protection using the fungus *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Environmental Management*, 231, 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.081>
- Sripriya, J., Anandhakumar, S., Achiraman, S., Antony, J. J., Siva, D., & Raichur, A. M. (2013). Laser receptive polyelectrolyte thin films doped with biosynthesized silver nanoparticles for antibacterial coatings and drug delivery applications. *International*

- Thangavelu, L., Adil, A. H., Arshad, S., Devaraj, E., Mallineni, S. K., Sajja, R., Chakradhar, A., & Karobari, M. I. (2021). Antimicrobial Properties of Silver Nitrate Nanoparticle and Its Application in Endodontics and Dentistry: A Review of Literature. *Journal of Nanomaterials*, 2021, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2021/9132714>
- Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., Rehman, H. ur, Ashraf, I., & Sanaullah, M. (2020). Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Science of The Total Environment*, 721, 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>
- Usman, M. S., El Zowalaty, M. E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., & Ibrahim, N. A. (2013). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4467–4479. <https://doi.org/10.2147/IJN.S50837>
- Vishnupriya, S., Chaudhari, K., Jagannathan, R. & Thalappil, P. (2013). Single-Cell Investigations of Silver Nanoparticle–Bacteria Interactions. *Particle & Particle Systems Characterization*, 30. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201300165>.
- Zhang, D., Ma, X. L., Gu, Y., Huang, H., & Zhang, G. W. (2020). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00799>
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.09.003>