



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Desarrollo de Nanomateriales de Quitosano y Plata para el Control de Fitopatógenos.

TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias, UDELAR

Estudiante:

IQ. Noheilly Vásquez

Directora:

Dra. Silvana Alborés

Co-Directora:

Dra. Helena Pardo



Montevideo, Abril 2024

Agradecimientos

En primera instancia a Dios, porque me trajo hasta acá, a este maravilloso país, que me ha permitido reencontrarme, conocer personas geniales que han sido mis maestros de vida.

Quiero agradecer a todas las instituciones que han apoyado la realización de este trabajo: Universidad de la República, Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias, Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por la Beca de Maestría, Proyecto FMV_1_2021_1_167206, Laboratorio de Biotecnología del Área de Microbiología de DEPPIO (Facultad de Química), Laboratorio de Nanotecnología del IPTP (Facultad de Química), Laboratorio de Bioquímica de DEPPIO (Facultad de Química), Facultad de Agronomía – Centro Regional del Sur (CRS), y al Dr. Eduardo Abreo del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Agradezco a mis directoras de tesis, Silvana Alborés y Helena Pardo, por la oportunidad, la confianza, el apoyo y el tiempo que me dedicaron. Gracias por permitirme divertirme y disfrutar de sus talentos. De verdad, ¡son geniales!

Muchas gracias a la Dra. Nicole Lecot, por realizar el seguimiento de este trabajo desde el inicio, con compromiso, responsabilidad y siempre en función del crecimiento y avance del proyecto y claro del mío.

En este sentido, le agradezco a las Dras. Ivana Aguiar y Paula Rodríguez, por aceptar ser parte del tribunal, por sus aportes y por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis.

Ahora bien, este trabajo no hubiese sido posible por los aportes de mis compañeros de laboratorio del Nanomat, me refiero a Analía Castro y a Pablo. Gracias por su ayuda, sus consejos y/o comentarios, también quiero agradecer por hacer que mi estadía en el laboratorio fuera divertido y entretenido. ¡Muchas gracias!

Agradezco la oportunidad de haber compartido con el equipo del CRS, por su sencillez, humildad, acompañamiento en las actividades realizadas en el CRS. Muchas gracias: Natalia Curbelo, Rosío Acosta, Guillermo Galván, pero en especial, del patroncito, Pablo Galeano, que fue un enlace con el CRS, además, de ser un gran profesor.

Gracias también a Eloisa Arrarte, por hacer aportes en pro de mejorar, aprender y avanzar. Elo, muchas gracias por tus palabras de aliento y perseverancia. ¡Sos una genia!

Hablando de equipos de trabajo, estoy agradecida de haber compartido con personas talentosas, amables y con empatía como es el caso de Silvana Vero y de Gabriela Garmendia. Muchas gracias por tener atención conmigo, por apoyarme, escucharme y alentarme a seguir adelante, pero sobre todo por alentarme a ser siempre yo, alegre. ¡Muchas gracias! Fueron fundamentales en todo este trayecto.

Agradecidas con todos mis compañeros de laboratorio: Paula Sanguineto, Soledad Martínez, Felipe, Eli, Roberto, Diego (tintin), Milly Buzo y Mateito, Sofía Raffaelli, Sofía

Giménez, Belén Estevez, Ana Clara Muniz, Giannella, Mariana, Natalia, Mellisa Mello, en especial a Fernanda, Valeria, Erika y Angie, muchas gracias chicos por ser mis maestros de vida, por siempre mostrarme otros puntos de vistas, por apoyarme en mis eventos deportivos, por enseñarme a ver la vida desde el amor, el perdón, las segundas oportunidades, pero sobre todo desde el respeto. ¡Los amo!

A mis amigos uruguayos del “club” Nicolás, Sofi, Alejandro, Constanza, Vane, Guille y el pana Tincho. Muchas gracias amigos, ustedes me enseñaron a amar a los uruguayos, sus costumbres, me escucharon y me dieron jalones de oreja cuando fue justo y necesario. Gracias por sus aportes para superar mis miedos y amar cada una de las actividades que realizaba. Fueron y son parte de mi faro.

A mí familia, debido a ellos, soy lo que soy. ¡Gracias!

Gracias Felipe (floripondio) por ayudarme a pisar tierra, gracias por ser un perro fantástico, que entiende, comprende, no juzga, das mucho amor y alegrías. Este escrito no hubiese sido posible sin tu ayuda, amigo. ¡Eres fantástico!

No puedo terminar, sin mencionar a mis amigos, a mi familia de vida, aquellas personas que desde que me conocieron, me adoptaron, amaron y me han alentado a superarme, a crecer, creer en mí, pero sobre todo han sido luz y esperanza en tiempos muy difíciles para mí. Muchas gracias Gloria, Santiago, Tazio, Carolina de Pablos, Alana, Xiomara, María de los Ángeles, Mariángel, Carmen, Mathías, Evaluna, Freddy, Fatimeña, Jesús Gabriel (mi sobrino hermoso), Carolina Urbáez, Titi y Jesús Calanche, Virgilio y Rosiris, mi dulce Rafael Sánchez, Susana Martínez, Miguelangel, Miguel, Rosmary, Yolanda, Wence, Kenia, pero en especial a mis amiguitas, mis catumpis favoritas: Rossi y Joelis. ¡Los amo a todos!

Simplemente...

¡Muchas Gracias!

RESUMEN

En el panorama actual, donde los desafíos ambientales y alimentarios son más apremiantes que nunca, resulta imperativo explorar soluciones innovadoras que aborden las complejidades de la producción agrícola y la seguridad alimentaria. En particular, las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos representan una preocupación significativa, ya que generan pérdidas considerables en la producción agrícola. A pesar de los avances en diagnóstico y tecnología, el control de estas enfermedades sigue siendo costoso y a menudo ineficiente, lo que impacta negativamente en la calidad, durabilidad y rentabilidad de los productos agrícolas. Además, contribuye a la inestabilidad económica de las empresas agrícolas y agrava el déficit alimentario a nivel mundial. En este contexto, la nanobiotecnología emerge como un campo prometedor que ofrece nuevas posibilidades para abordar estos desafíos. La aplicación de nanopartículas de plata biogénicas, así como nanomateriales basados en quitosano ha demostrado ser una estrategia efectiva para el control de fitopatógenos de cultivos. Basado en estos antecedentes, esta tesis se enfocó en la síntesis, caracterización y evaluación antifúngica de nanomateriales basados en quitosano y plata. Se sintetizaron nanopartículas de plata biogénicas a partir de *Phanerochaete chrysosporium* (PchNPs), *Punctularia atropurpurascens* (PaNPs) y *Trichoderma harzianum* (ThNPs). Posteriormente, se procedió a la síntesis de nanohíbridos combinando quitosano y las nanopartículas biogénicas, así como a la síntesis de nanopartículas de quitosano. Los nanomateriales resultantes fueron caracterizados mediante diversas técnicas complementarias, obteniéndose en todas las síntesis nanomateriales estables y con baja polidispersidad de tamaños. Los resultados muestran que los nanomateriales obtenidos poseen una actividad antifúngica prometedora frente a una variedad de fitopatógenos de importancia agrícola, y en particular frente a hongos que afectan cultivos de trigo, arroz y cebolla en Uruguay. Además, en los ensayos realizados con semillas de arroz y trigo tratadas con estos nanosistemas no se observaron efectos tóxicos ya que los mismos no afectaron la germinación. Es relevante destacar que los nanohíbridos CS-PchNPs y CS-PaNPs mostraron una mayor actividad antifúngica frente a los fitopatógenos evaluados. Por otro lado, el tratamiento de plantas de cebolla con CS-PchNPs, previo a la inoculación del patógeno *B. squamosa*, produjo una reducción significativa del porcentaje de área de hoja afectada comparado con el control sin tratamiento, lo que sugiere su potencial acción como inductor de respuesta de defensa en la planta. En resumen, la sinergia entre el quitosano y las nanopartículas de plata biogénicas representa una oportunidad única para el desarrollo de materiales híbridos como los obtenidos en esta tesis, con propiedades beneficiosas para diversas aplicaciones biotecnológicas y en particular en agricultura.

Palabras claves: Nanopartículas de plata biogénicas, Nanohíbridos de quitosano y plata, nanopartículas de quitosano, actividad antifúngica, cultivos de cebolla, trigo y arroz.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	ii
RESUMEN	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS.....	xii
Sección I	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Importancia de las enfermedades vegetales	2
1.2 Uso de agroquímicos frente a fitopatógenos.....	5
1.3 La Nanotecnología en el sector agrícola.	7
1.4 Una alternativa amigable a los agroquímicos.	10
1.5 Actividad antifúngica de nanopartículas biogénicas.	12
1.5.1 Nanopartículas de plata biogénicas como agentes antifúngicos	13
1.6 Quitosano: Un Recurso a considerar contra los Fitopatógenos.....	15
1.7 Nanosistemas plata-CS.....	16
1.8 Antecedentes en Uruguay	17
2. Hipótesis.	19
3. Objetivos.	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
Sección II	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21

4.1 Material biológico	21
4.2 Métodos.....	21
4.2.1. Síntesis y purificación de los NMs.....	21
4.2.2 Caracterización de los NMs.....	26
4.2.3. Actividad antifúngica in vitro de los NMs.....	28
4.2.4 Evaluación del efecto de los NMs en la germinación de semillas de trigo y arroz.	31
4.2.5. Evaluación de inducción de resistencia a Botrytis squamosa de los NMs.....	32
Sección III	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
5.1. Síntesis y caracterización de los NMs.....	35
5.1.1. Resultados.....	35
5.1.2 Discusión	61
5.2 Actividad antifúngica in vitro de los NMs frente a patógenos de relevancia agrícola.	67
5.2.1 Resultados.....	67
5.2.2 Discusión	76
5.3 Evaluación del efecto de los NMs en la germinación de semillas de trigo y arroz. .	80
5.3.1 Resultados.....	80
5.3.2 Discusión	83
5.4 Evaluación de inducción de resistencia a Botrytis squamosa en plantas de cebolla por los NMs.....	84
5.4.1 Resultados.....	84
5.4.2 Discusión	88
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	91

Índice general

6.1 Conclusiones.	91
Síntesis y caracterización de NMs.	91
Evaluación antifúngica frente a fitopatógenos de interés agrícola.	91
Evaluación del efecto de los NMs en la germinación de semillas de trigo y arroz.	91
Evaluación de inducción de resistencia a <i>Botrytis squamosa</i> en plantas de cebolla por los NMs.	92
6.2 Perspectivas.	92
7. BIBLIOGRAFÍA.	93
ANEXOS.	122
Composición de medios empleados.	122
Mueller Hinton Broth (HIMEDIA®).	122
Potato Dextrose Agar (OXOID®).	122
Potato Dextrose Broth (Sigma-Aldrich®).	122
Publicación resultante de esta investigación académica.	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espigas y granos de trigo afectados por la enfermedad de Fusarioris de la Espiga ocasionada por el patógeno <i>Fusarium graminearum</i> (INIA La Estanzuela, 2014).	3
Figura 2. Cultivo de arroz afectados por las enfermedades: A) Tizón de arroz, B) manchado de vainas foliares y C) podredumbre del tallo, ocasionados por los patógenos <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i> y <i>Sclerotium oryzae</i> , respectivamente (Gutiérrez et al., 2021).	5
Figura 3. Manchas, lesiones y quemaduras en las hojas de cebolla ocasionados por el patógeno <i>Botrytis squamosa</i> (Tanović et al., 2019).	5
Figura 4. Ilustración esquemática de las posibles aplicaciones de NMs en la agricultura (Omran & Baek, 2022).	10
Figura 5. Metodología de síntesis de AgNPs biogénicas a partir de hongo. Creado con Biorend.com.	22
Figura 6. Metodología de síntesis de CSNPs mediante gelación iónica (Wu et al. 2020; Zimet et al. 2018).	24
Figura 7. Síntesis de los NHs a partir de NPs biogénicas y CS.	25
Figura 8. Proceso de pretratamiento de filtrado de micrografías de una región seleccionada para análisis (Obeso–Estrella et al., 2022).	27
Figura 9. Proceso para discriminar la estructura basándose en los datos medidos y extraídos de la base de datos (Obeso–Estrella et al., 2022).	28
Figura 10. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los NMs.	30
Figura 11. Evaluación de la actividad antifúngica de los NMs en agar incorporado.	30
Figura 12. Tratamiento de semillas de arroz y trigo. Creado con Biorend.com.	32
Figura 13. Tratamiento <i>in vivo</i> de los NMs en plantas de cebolla.	33
Figura 14. Espectros de absorción de UV-vis de las NPs biogénicas (PchNPs, PaNPs y ThNPs). Donde las curvas azules es la medición a tiempo de reacción (t) 0 h, las curvas amarilla a t= 24 h, la verde a t= 48 h de reacción y las curvas roja son las medidas de las NPs luego de haber sido centrifugadas, lavadas y resuspendidas en agua.	36

Índice de figuras

Figura 15. Espectros de absorción de UV-vis de NHs a partir de PchNPs, donde NHPch1, NHPch2 y NHPch3, corresponden a concentraciones de partida de CS 1,2; 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.	38
Figura 16. Espectros de absorción de UV-vis de NHs a partir de PaNPs, donde NHPa1, NHPa2 y NHPa3 corresponden a concentraciones de partida de CS 1,2; 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.	38
Figura 17. Espectros de absorción de UV-vis de NHs a partir de ThNPs, donde NHTh1, NHTh2 y NHTh3, corresponden a concentraciones de partida de CS 1,2; 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.	39
Figura 18. Curvas de DLS de las AgNPs biogénicas sintetizadas.....	40
Figura 19. Diámetros hidrodinámicos promedios de las CSNPs, determinados por DLS.	41
Figura 20. DLS de los nanohíbridos a partir de las nanopartículas PchNPs y a diferentes concentraciones de CS, 1,2, 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.	42
Figura 21. DLS de los nanohíbridos a partir de las nanopartículas PaNPs y a diferentes concentraciones de CS, 1,2, 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.	43
Figura 22. DLS de los nanohíbridos a partir de las nanopartículas ThNPs y a diferentes concentraciones de CS, 1,2, 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.	43
Figura 23. Patrón de difracción del CS y las NPs de CS.	47
Figura 24. Patrón de Difracción de Rayos X del CS, NPs biogénicas (PchNPs) y del NHPch. .	48
Figura 25. Patrón de XRD del CS, NPs biogénicas (PaNPs) y del NHPa.....	49
Figura 26. Patrón de XRD del CS, NPs biogénicas (ThNPs) y del NHTh.....	50
Figura 27. Espectro de FTIR del CS y de las NPs de CS.	51
Figura 28. Espectro de FTIR del CS, NPs biogénicas (PchNPs) y del NHPch.....	53
Figura 29. Espectro de FTIR del CS, NPs biogénicas (PaNPs) y del NHPa.	55
Figura 30. Espectro de FTIR del CS, NPs biogénicas (ThNPs) y del NHTh.	57
Figura 31. Micrografías de los NHPch1 a diferentes escalas: a) 200 nm, b) 100 nm y c) 50 nm; d) histograma de las mediciones de tamaños de partículas.	58
Figura 32. Mediciones de distancias interplanares y determinación de fases cristalinas presentes en los NHPch.	60

Índice de figuras

Figura 33. Análisis espectral EDS de los NHPch.....	61
Figura 34. Tratamientos a las semillas de trigo con los NHPa1 y NHTh1, comparados con el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).	80
Figura 35. Tratamientos a las semillas de trigo con NHPch1, PchNPs y PaNPs, comparados con el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).	81
Figura 36. Tratamientos a las semillas de trigo con la solución de CS y las CSNPs, comparados con el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).	81
Figura 37. Tratamientos a las semillas de arroz con los NHPa1 y NHTh1, comparados con el control (sin tratamiento). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).....	82
Figura 38. Tratamientos a las semillas de arroz con NHPch1, PchNPs y PaNPs, comparados con el control (sin tratamiento). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).	82
Figura 39. Comparación de manchas foliares de la tercera hoja de plantas de cebollas infectadas con el patógeno <i>B. squamosa</i> y tratadas con b) Biorend®, c) solución de CS, d) CSNPs y e) NHPch. El porcentaje promedio de área infectada por cada tratamiento y su desviación estándar se muestra en f).	85
Figura 40. Comparación del % de área infectada con <i>B. squamosa</i> de cada uno de los tratamientos en la hoja 3. Se indican con * diferencias estadísticamente significativas (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).....	86
Figura 41. Comparación de manchas foliares de la cuarta hoja de plantas de cebollas infectadas con el patógeno <i>B. squamosa</i> y tratadas con b) Biorrend, c) solución de CS, d) CSNPs y e) NHPch, f) muestra el porcentaje de área infectada por cada tratamiento.	87
Figura 42. Comparación del % de área infectada con <i>B. squamosa</i> de cada uno de los tratamientos en la hoja 4. Se indican con * diferencias estadísticamente significativas (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de reacción para sintetizar las NPs de CS.....	23
Tabla 2. Condiciones de síntesis de los NHs de CS-Ag.	25
Tabla 3. Diámetros hidrodinámicos e índices de polidispersidad de los NHs.	42
Tabla 4. Potencial Z de las NPs biogénicas sintetizadas.	44
Tabla 5. Diámetros hidrodinámicos y Potencial Z de las NPs de CS.	44
Tabla 6. Potencial Z de los NHPch.....	45
Tabla 7. Potencial Z de los NHPa.....	45
Tabla 8. Potencial Z de los NHTh.....	46
Tabla 9. Porcentajes de elementos presentes en la síntesis de los NHPch.....	60
Tabla 10. CIM de las NPs biogénicas de plata (PchNPs, PaNPs y ThNPs).	68
Tabla 11. CIM de la solución de CS y de las CSNPs.....	69
Tabla 12. CIM de los NHs frente a <i>A. niger</i> y <i>F. graminearum</i>	70
Tabla 13. Concentración Inhibitoria Mínima de los NHPch1, NHPa1 y NHTh1, frente a <i>P. oryzae</i> y <i>P. expansum</i>	71
Tabla 14. CIM de fungicidas comerciales frente <i>A. niger</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>P. oryzae</i> y <i>P. expansum</i>	72
Tabla 15. CE50 de la solución de CS frente a fitopatógenos de arroz y cebolla.....	73
Tabla 16. CE50 de las AgNPs biogénicas y de los NH frente a fitopatógenos de arroz y cebolla.	74
Tabla 17. Comparación de porcentajes de inhibición producidos por los nanosistemas a la misma concentración ($\approx 0,10 \mu\text{g/mL}$) frente a los fitopatógenos de arroz y cebolla.....	75

ABREVIATURAS

AgNPs – Nanopartículas de plata

Ag/AgClNPs – Nanopartículas de plata-cloruro de plata

CIM – Concentración Inhibitoria Mínima

CS – Quitosano

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

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

ELS – *Electrophoretic Light Scattering* - Dispersión de luz electroforética

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier

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

NHs – Nanohíbridos

NHPa – NHs de CS- nanopartículas biogénicas de *Punctularia atropurpurascen*

NHPch – NHs de CS- nanopartículas biogénicas de *Phanerochaete chrysosporium*

NHTh – NHs de CS- nanopartículas biogénicas de *Trichoderma harzianum*

NMs – Nanomateriales

NPs – Nanopartículas

PaNPs – Nanopartículas biogénicas de *Punctularia atropurpurascen*

PchNPs – Nanopartículas biogénicas de *Phanerochaete chrysosporium*

PDA – *Potato Dextrose Agar* -Agar Papa Dextrosa

PDB – *Potato Dextrose Broth* – Caldo Papa Dextrosa

PDI – *Polydispersity Index* - Índice de Polidispersidad

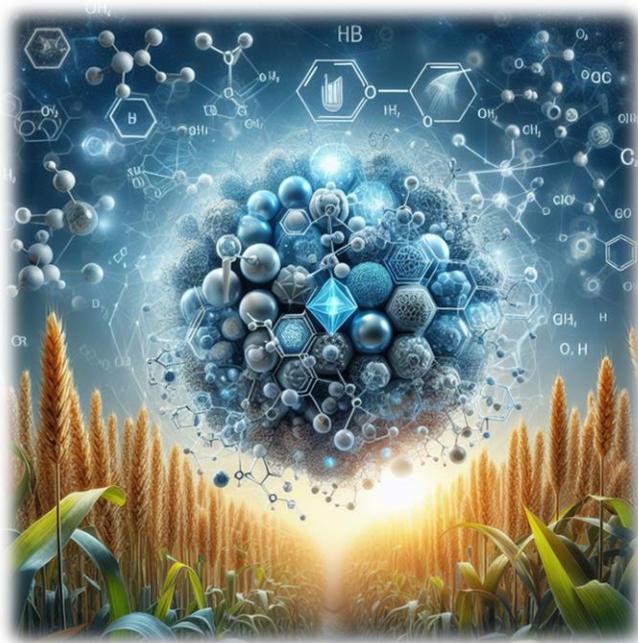
Abreviaturas

RPS – Resonancia de Plasmón Superficial

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

ThNPs – Nanopartículas biogénicas de *Trichoderma harzianum*

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



Sección I

1. Introducción
2. Hipótesis
3. Objetivos

“Todo lo que somos se lo debemos a la agricultura. Pero también a nuestra capacidad para enfrentar los desafíos que los fitopatógenos nos presentan”.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Importancia de las enfermedades vegetales

La agricultura juega un papel crucial en el sustento y progreso de la humanidad. Se estima que la población global alcanzará más de 9.7 mil millones para 2050 y superará los 11 mil millones para 2100 (Ioannou et al., 2020). En la actualidad, se requieren de dos a tres mil millones de toneladas de cereales para alimentar a los 7.9 mil millones de habitantes del mundo, y se proyecta un incremento del 50% en la producción anual para cubrir esta demanda (Mahapatra et al., 2022). Sin embargo, el sector agrícola se enfrenta a varios desafíos globales, incluida la urbanización, el crecimiento demográfico y factores ecológicos, como el cambio climático, las inundaciones, la sequía, las tormentas y la salinidad, que causan daños a los tejidos vegetales y pérdidas significativas de cultivos agrícolas. El aumento de áreas para la agricultura enfrenta límites en varias regiones por escasez de agua dulce y falta de infraestructura. Además, expandir tierras agrícolas puede llevar a deforestación, socavando la sostenibilidad por la pérdida de biodiversidad y emisiones de gases de efecto invernadero. La intensificación de cultivos es una opción, pero debilita la fertilidad del suelo, provocando una pérdida importante de nutrientes (Garibaldi et al., 2019). En el siglo XXI, el foco principal de la agricultura es adoptar prácticas sostenibles para garantizar la seguridad alimentaria y reducir al máximo posibles impactos ambientales (Abd Elaziz et al., 2022).

Las enfermedades vegetales representan obstáculos significativos para el avance agrícola y la seguridad alimentaria global. Disminuyen la producción de cultivos al afectar su crecimiento, desarrollo y calidad, tanto en el campo como durante el almacenamiento. Estas enfermedades tienen su origen en factores bióticos o abióticos que generan estrés en las plantas (Chakraborty & Krishnani, 2022). Bacterias, virus, hongos patógenos, plagas y malezas son factores bióticos que desencadenan diversas enfermedades en las plantas, representando una pérdida de productividad agrícola que oscila entre el 20% y el 40% (Ayaz et al., 2023). Su gravedad varía de leve a grave según la agresividad del agente, la resistencia de la planta, el entorno y la duración de la afectación. Las hojas suelen ser las primeras afectadas y su análisis revela síntomas que ayudan en el diagnóstico. Estas enfermedades

disminuyen la disponibilidad de alimentos al afectar la producción y calidad de los cultivos, generando inseguridad alimentaria y, en casos extremos, hambruna y pérdida de vidas (Al-Sadi, 2017).

Las enfermedades de las plantas también pueden resultar problemáticas para los humanos debido a la producción de metabolitos tóxicos por parte de hongos fitopatógenos, conocidos como micotoxinas. En las últimas décadas, ha habido crecientes preocupaciones acerca de las micotoxinas debido a sus impactos en la salud humana y animal, así como en la productividad agrícola y el comercio. Estos compuestos pueden acumularse durante la cosecha o en el almacenamiento, formándose en los restos de plantas dejados en el campo o directamente en los cultivos en crecimiento y tienen la capacidad de acumularse en seres humanos y animales a través de la cadena alimentaria (Juraschek et al., 2022).

En el caso específico del Uruguay, se ven afectados cultivos de importancia, como trigo, arroz y cebolla. Por ejemplo, en cultivos de trigo, se ve afectada por la enfermedad Fusariosis de la Espiga (Figura 1), ocasionada principalmente por el patógeno más agresivo y prevalente de la región *Fusarium graminearum* (INIA La Estanzuela, 2014). Este hongo genera: una reducción en la calidad comercial de los granos, disminuye el poder germinativo y el vigor de las semillas, lo que puede causar pérdidas de rendimiento de hasta un 30 % y aún más importante, produce micotoxinas, que resulta extremadamente tóxica para los mamíferos y para las personas en general.



Figura 1. Espigas y granos de trigo afectados por la enfermedad de Fusariosis de la Espiga ocasionada por el patógeno *Fusarium graminearum* (INIA La Estanzuela, 2014).

Asimismo, la producción de arroz, se ve limitada por fitopatógenos como: 1) *Pyricularia oryzae* que ocasiona la enfermedad Tizón del arroz, lesiones en formas de diamante que ocurre en las hojas (Figura 2); 2) *Rhizoctonia oryzae-sativae* produce manchas en vainas foliares, lo que puede llegar a causar grandes pérdidas (Figura 2); y 3) *Sclerotium oryzae* que es el agente causal de la podredumbre del tallo (Figura 2), registrando pérdidas de hasta el 80% (Gutiérrez et al., 2021).

Por otro lado, *Botrytis squamosa* es el responsable de la quemadura en las hojas de la cebolla (Figura 3). La enfermedad tiene dos etapas distintas: en la primera, se observan manchas en las hojas que aumentan gradualmente; luego, en la segunda etapa, las quemaduras en las hojas se desarrollan rápidamente debido al aumento tanto del inóculo transportado por el aire como del número de lesiones (Carisse et al., 2008; Tanović et al., 2019). Los primeros síntomas visibles causados por *B. squamosa* son pequeñas manchas necróticas de aproximadamente 2 mm de diámetro, rodeadas por un halo plateado. Estas pueden confundirse con daños provocados por sequía o exceso de humedad en el suelo. La segunda etapa de la enfermedad resulta en la muerte prematura de las hojas, así como en el desarrollo insuficiente y de menor tamaño de los bulbos. Además, el cuello del bulbo se seca de manera inadecuada, lo que proporciona un punto de entrada para la pudrición del cuello por parte de *Botrytis* y otros hongos (Tanović et al., 2019). La esporulación de *B. squamosa* solo ocurre en tejidos de hojas senescentes, por lo que el avance de la enfermedad suele ser lento al inicio de la temporada, cuando la mayoría de las hojas están verdes. No obstante, a medida que estas hojas envejecen, el potencial de esporulación aumenta rápidamente, lo que influye en la velocidad de progresión de la enfermedad (Carisse et al., 2008; Tanović et al., 2019).



Figura 2. Cultivo de arroz afectados por las enfermedades: A) Tizón de arroz, B) manchado de vainas foliares y C) podredumbre del tallo, ocasionados por los patógenos *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*, respectivamente (Gutiérrez et al., 2021).



Figura 3. Manchas, lesiones y quemaduras en las hojas de cebolla ocasionados por el patógeno *Botrytis squamosa* (Tanović et al., 2019).

1.2 Uso de agroquímicos frente a fitopatógenos.

En las últimas décadas, los productos químicos agrícolas han sido efectivos controlando enfermedades en plantas y limitando pérdidas masivas en la producción de cultivos. No obstante, su uso indebido y excesivo ha causado resistencia en patógenos, contaminación del entorno y acumulación en seres vivos no deseados. Esta acumulación supone una amenaza para la biodiversidad y plantea riesgos para la salud humana y animal a través de la cadena alimentaria (Xu et al., 2021). Es crucial buscar alternativas respetuosas con el medio

ambiente para controlar enfermedades vegetales y asegurar una agricultura sostenible. La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas propone estrategias para garantizar la seguridad alimentaria. Esto incluye adaptar cultivos a cambios ambientales, mejorar la eficiencia de recursos mediante la agricultura de precisión, cerrar la brecha de rendimiento debido a limitaciones geográficas, biológicas y socioeconómicas, y adoptar métodos efectivos de almacenamiento y reciclaje para reducir la pérdida de alimentos (Majumdar & Keller, 2021; Omran & Baek, 2022).

Se han ideado diversas estrategias para controlar enfermedades en plantas, adaptadas según la especie, los patógenos, la ubicación geográfica, la tecnología disponible y las políticas gubernamentales. Estas estrategias abarcan métodos agronómicos, regulatorios, genómicos, físicos, químicos y biológicos, que pueden aplicarse de manera individual o combinada como el manejo integrado de enfermedades en plantas. Estas tácticas tienen como objetivo inhibir patógenos, fortalecer la resistencia de las plantas y modificar los ambientes donde interactúan plantas y patógenos. Mejorar la resistencia de las plantas es una de las estrategias más eficientes y respetuosas con el entorno para combatir fitopatógenos (Zhang et al., 2021).

El cultivo intensivo y los monocultivos, tan comunes en la agricultura moderna, facilitan la evolución de cepas resistentes, siendo una preocupación significativa (Zhan et al., 2015). Cuando la resistencia de las plantas no es suficiente para controlar brotes de enfermedades vegetales, el uso de pesticidas se vuelve necesario. Existen una amplia gama de pesticidas, clasificados según el tipo de plaga o fitopatógeno que atacan (Kumar et al., 2019). Estos pesticidas, ya sean orgánicos o inorgánicos, han contribuido al aumento en la producción de cultivos, pero su uso indiscriminado plantea preocupaciones ambientales. La acumulación en el suelo y aguas subterráneas, derivada de su composición química, representa riesgos para la salud y el ecosistema (Zhou & Li, 2021). Además, su uso reduce la polinización, daña la fauna, genera resistencia en fitopatógenos y provoca tolerancia a otras sustancias químicas (Hernández-Díaz et al., 2021). La ineficacia a largo plazo de los pesticidas, sumada a la aparición constante de nuevas cepas patógenas, presenta desafíos en el manejo de enfermedades de las plantas. La detección complicada y costosa de estas enfermedades,

junto con la propagación de infecciones a larga distancia y la comprensión limitada de la epidemiología de los fitopatógenos, continúa siendo un desafío (Hyatt-Twynam et al., 2017; Nanehkaran et al., 2020; Wingen et al., 2013).

1.3 La Nanotecnología en el sector agrícola.

La nanotecnología aplicada al sector agrícola es un área emergente cuyo constante desarrollo está abriendo un mundo de nuevas posibilidades, en particular para el control de enfermedades causadas por microorganismos, por lo que, se anticipa un crecimiento significativo en la aplicación de nanotecnología en la agricultura sostenible en los años venideros. Los nanomateriales (NMs) tienen el potencial de aumentar considerablemente la producción de alimentos debido a sus efectos positivos en los cultivos (Hamers, 2017; Majumdar & Keller, 2021; Omran & Baek, 2022).

La nanotecnología se define como la capacidad de observar, manipular y controlar las propiedades de la materia a niveles de nanoescala. Los materiales a nanoescala (de 1 a 100 nm) exhiben propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes de los materiales de mayor tamaño. Además, debido a su gran área superficial específica, las nanopartículas son altamente reactivas. Según algunos autores (Ali et al., 2021), la fuerza de la nanotecnología radica principalmente en hacer productos más eficientes y multifuncionales, ahorrando así materias primas. La nanotecnología tiene la capacidad de controlar, manipular y fabricar nuevos materiales con numerosas aplicaciones en la actualidad, alcanzando límites inimaginables, incluida la capacidad de controlar átomos individuales (Arora et al., 2022). Por lo tanto, la nanociencia y la nanotecnología han sido áreas importantes del desarrollo científico y tecnológico en los últimos 30 años (Ali et al., 2021).

Debido a las propiedades particulares de los NMs que permiten su uso en diversas aplicaciones, es fundamental realizar una caracterización integral de los mismos. Por ejemplo, en el caso de las nanopartículas metálicas, tanto la estabilidad coloidal como las propiedades ópticas dependen del tamaño, forma y distancia entre las nanopartículas y determinan su uso en diversas aplicaciones. 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 el incremento en el valor máximo de la absorbancia característica a medida que avanza el 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 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. Por ejemplo, el análisis de microscopía Raman confocal de las AgNPs producidas por *Phanerochaete chrysosporium* mostró bandas Raman atribuidas a la presencia de L-valina y L-alanina, que podrían provenir del extracto proteico fúngico (Estevez et al., 2020).

La nanotecnología ya se aplica en varios campos, incluidos la medicina, los productos farmacéuticos, la electrónica y la energía (Darwesh et al., 2020). Del mismo modo, se espera que desempeñe un papel fundamental en los sectores agrícola y alimentario mejorando la seguridad alimentaria, la calidad de los cultivos y la productividad.

La nanotecnología ha sido ampliamente empleada (Figura 4) en diversas áreas agrícolas (Majumdar & Keller, 2021; Omran & Baek, 2022), mostrando un gran potencial en el

desarrollo de importantes novedosos nuevos materiales y sistemas para: mejora de la resistencia de las plantas al estrés, eliminando especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante nanoenzimas (Liu et al., 2021), aumento de la tolerancia de las plantas a factores ambientales estresantes como salinidad, sequías, altas y bajas temperaturas (Noman et al., 2021; Rai-Kalal et al., 2021; A. Wang et al., 2021; Zohra et al., 2021), facilitación de la liberación controlada de agroquímicos (Santana et al., 2020).

Los NMs podrían ser clave en una próxima revolución en la agricultura al proporcionar sistemas agrícolas más efectivos, defendibles y resilientes que los protocolos actuales (Farooq et al., 2022; Majumdar & Keller, 2021). Además, las nanoestructuras pueden actuar como nanosensores para detectar tempranamente estrés y enfermedades en las plantas (Giraldo et al., 2019), así como servir como plataformas de entrega para material genético en especies vegetales no modelo (Demirer et al., 2019). Otras posibles aplicaciones incluyen nanopesticidas, nanoherbicidas, nanofertilizantes, promotores del crecimiento vegetal, agentes antimicrobianos (Figura 4), mejora de la integridad del suelo y más (Agathokleous et al., 2020; Bombo et al., 2019; Farooq et al., 2022; Khan et al., 2021; Okey-Onyesolu et al., 2021; Rajwade et al., 2020; Yi et al., 2021).

Los diferentes tipos de nanoestructuras, como las basadas en carbono (nanotubos, óxido de grafeno, entre otros) nanopartículas metálicas, de óxido metálico (nanopartículas basadas en Ag, Cu, Ti, Ce, Mg, Si, Fe y Zn), polímeros (CS) y las nanoestructuras porosas han mostrado aplicaciones significativas en la agricultura (Asadishad et al., 2018; Mukherjee et al., 2016; Rodríguez-González et al., 2019; A. Sharma et al., 2019; Yi et al., 2021). Por ejemplo, materiales como organometálicos, sílice mesoporosa, carbono poroso, polímeros, nanoarcilla, biocarbón, zeolita y carbonato de calcio han facilitado la entrega de nutrientes y el desarrollo de sensores para la detección de agroquímicos y aplicaciones de pesticidas (Asadishad et al., 2018; Mukherjee et al., 2016; Rodríguez-González et al., 2019; S. Sharma et al., 2021; X. Wang et al., 2014; Yi et al., 2021). Los puntos cuánticos (nanoestructuras semiconductoras tridimensionales), también han sido útiles en la detección de enfermedades en plantas (Rad et al., 2012; Safarpour et al., 2012).

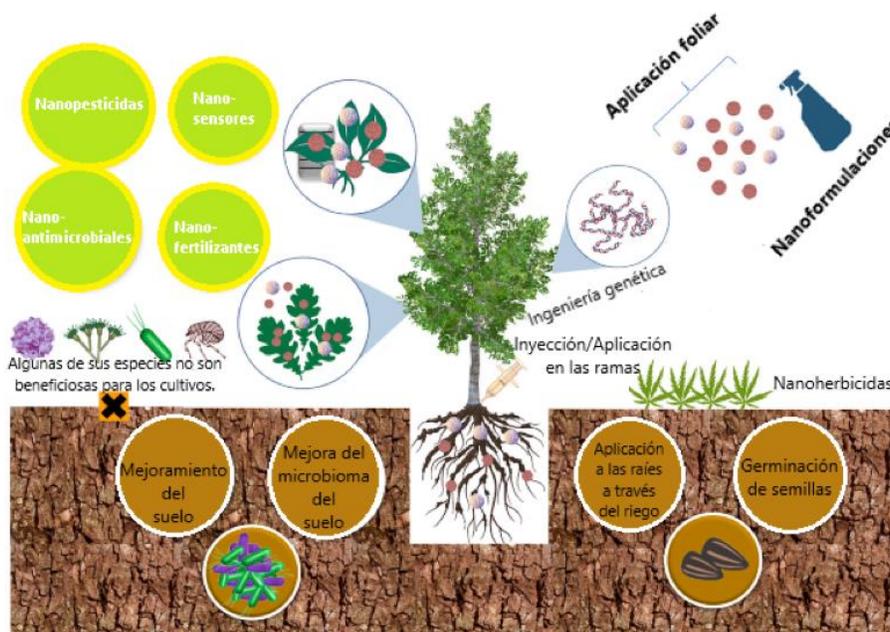


Figura 4. Ilustración esquemática de las posibles aplicaciones de NMs en la agricultura (Omran & Baek, 2022).

1.4 Una alternativa amigable a los agroquímicos.

La síntesis química y física de NMs puede implicar costos elevados, el uso de reactivos auxiliares y altos niveles de energía. Estos procesos suelen generar subproductos tóxicos y en ocasiones tienen una conversión baja de material. Como respuesta, se han desarrollado técnicas de síntesis más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, impulsadas por comunidades académicas, industriales y gubernamentales. La adopción de enfoques sistémicos para regular y estandarizar los procesos de síntesis es clave para avanzar en el campo de la nanotecnología. Una de las estrategias principales ha sido la síntesis biológica de NMs utilizando células procariotas/eucariotas o sus biomoléculas extraídas (Huguet-Casquero et al., 2021; Nasaruddin et al., 2021; Omran, 2020c, 2020b). La emergente "nanociencia verde" se centra en la síntesis ecológica de NMs, promoviendo un enfoque holístico para desarrollar productos más sostenibles, en línea con los principios de la química verde (Nehra et al., 2021; Omran et al., 2021). La síntesis biológica de NMs ofrece una alternativa rentable y simple, reduciendo la liberación de productos químicos tóxicos al medio ambiente y eliminando procesos innecesarios. Estos NMs biogénicos se funcionalizan con diversas biomoléculas, mejorando su estabilidad y eficiencia en diversas aplicaciones.

Esta estabilidad se puede atribuir a las interacciones electrostáticas y estéricas entre las biomoléculas cargadas que rodean la superficie de los NMs biogénicos (Omran, 2020a, 2022). La síntesis verde de NMs ha demostrado ser una solución avanzada para la agricultura de precisión, permitiendo la entrega controlada y la mejora de las condiciones de crecimiento de suelos y plantas. Esto resulta en un incremento de la productividad, eficiencia y viabilidad económica (Wu & Li, 2022). Los NMs biogénicos han mostrado eficacia en el control de fitopatógenos en una amplia gama de cultivos, incluyendo sorgo, arroz, zanahoria, café, soja, tomate, remolacha azucarera, papa, maíz, trigo, caña de azúcar, repollo, naranja dulce, pimienta, frijoles leguminosos, frutilla y mirtilo (Abdelaziz et al., 2021; Ahmed et al., 2021; Ajaz et al., 2021; Ali et al., 2021; Arciniegas-Grijalba et al., 2019; Bayat et al., 2021; Bilesky-José et al., 2021; El-Gazzar & Ismail, 2020; Ghazy et al., 2021; Ibrahim et al., 2019; Irshad et al., 2020; Joshi et al., 2021; Kora et al., 2020; Lakshmeesha et al., 2020; Mostafa et al., 2021; Sathiyabama et al., 2020; Siddiqui et al., 2019; Singh et al., 2022; Vijayabharathi et al., 2018; Yi et al., 2021; Yugay et al., 2021).

Los NMs biogénicos pueden ofrecer múltiples ventajas, como su compatibilidad con organismos vivos, coste reducido y respeto por el entorno, convirtiéndolos en una estrategia segura para combatir enfermedades en cultivos. Las moléculas bioactivas presentes en organismos como microorganismos y plantas, desempeñan un papel crucial en la síntesis de estos NMs, actuando como agentes naturales que reducen y estabilizan, facilitando la formación de NMs biogénicos uniformes y encapsulados. A pesar de la extensa investigación sobre el potencial uso de estos NMs biogénicos contra enfermedades causadas por patógenos en plantas, aún persiste la incógnita sobre su modo de acción preciso. Algunos mecanismos antimicrobianos propuestos hasta ahora incluyen la descomposición de proteínas, la generación de especies reactivas de oxígeno, la perturbación de membranas celulares, la interferencia en la absorción de nutrientes y la genotoxicidad (Baker et al., 2017; Lemire et al., 2013). No obstante, en ocasiones, estos mecanismos operan en conjunto en lugar de actuar de forma individual (Alghuthaymi et al., 2015).

1.5 Actividad antifúngica de nanopartículas biogénicas.

En general, los NMs biogénicos han evidenciado una actividad antifúngica superior a la de los fungicidas químicos. Se examinó el potencial antifúngico de nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas biológicamente utilizando *Bacillus* spp. AW1 2 contra *C. falcatum* Went. El uso de AgNPs redujo el crecimiento fúngico en comparación con el carbendazim (un fungicida químico) (Ajaz et al., 2021).

Thielaviopsis basicola y *Phytophthora nicotianae*, patógenos fúngicos del suelo, son responsables de enfermedades como la pudrición negra de raíces y la mancha negra, respectivamente, afectando a más de 50 especies vegetales (Williamson-Benavides & Dhingra, 2021). Las nanopartículas de óxido de magnesio biosintetizadas a partir del extracto de hojas de *Carica papaya* L. mostraron una destacada actividad antifúngica (J. Chen et al., 2020). Su efectividad contra *T. basicola* y *P. nicotianae* superó la del MgO a escala macro en experimentos in vitro, exhibiendo una inhibición dependiente de la concentración.

Varios estudios han señalado la mayor eficacia antifúngica de las nanopartículas biosintetizadas en comparación con las sintetizadas químicamente (Arciniegas-Grijalba et al., 2019; Irshad et al., 2020; Perveen et al., 2020). En específico, se observó que las NPs de selenio mediadas por *Trichoderma* fueron más efectivas contra *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. en comparación con las NPs de selenio (Se) generadas químicamente (Hu et al., 2019). Las nanopartículas biogénicas mostraron adsorción de diversos metabolitos, como ácidos orgánicos y derivados (por ejemplo, ácido β -deciloxibenzoico, ácido psorómico y lactona de ácido glucárico), identificados mediante técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas de alta resolución. Esta interacción modificó la disposición de las TSNPs, mejorando su actividad antifúngica en comparación con las SeNPs convencionales.

Rhizoctonia solani (H. Li et al., 2018), es el agente causal de la quema de vainas en el arroz. El control de *R. solani*, se realiza comúnmente mediante prácticas culturales (como la cosecha temprana, el manejo adecuado de los residuos de cultivos, implementación de métodos de solarización y encalado del suelo) y el uso excesivo de fungicidas. Sin embargo,

estas estrategias plantean preocupaciones por su impacto ambiental, toxicidad residual y la resistencia del patógeno. AgNPs esféricas biosintetizadas con extracto de hojas de arroz demostraron inhibición del crecimiento de hifas de diferentes aislados de *R. solani*, (Kora et al., 2020; Nejad et al., 2017).

Asimismo, *Sclerotinia sclerotiorum* causa daños considerables en más de 400 especies vegetales (Boland & Hall, 1994). Este patógeno produce sustancias como ácido oxálico, que contribuye a su patogenicidad al generar especies reactivas del oxígeno en las células vegetales (Kyoung et al., 2008). Puede formar estructuras resistentes llamadas esclerocios, que prolongan su supervivencia en ausencia de nutrientes durante varios años (Bolton et al., 2006). Para controlar este fitopatógeno, se produjeron nanopartículas de hematita biogénicas con *Trichoderma harzianum*, lo que mejoró la capacidad de control biológico de *T. harzianum* sobre *S. sclerotiorum*, reduciendo el crecimiento y la germinación de nuevos esclerocios (Bilesky-José et al., 2021).

Por otro lado, se reportó el uso de NPs biogénicas para el control de *Phytophthora infestans*, conocido por causar la enfermedad del tizón tardío en tomates y papas. A pesar de que anteriormente no se consideraba una amenaza importante para los tomates en India, episodios severos resultaron en pérdidas totales durante las temporadas de cultivo de 2009 y 2010 en Karnataka (Chowdappa et al., 2013). En un estudio reciente, las SeNPs micogénicas desencadenaron respuestas de resistencia en el tomate contra *P. infestans*, mostrando protección (Joshi et al., 2021).

1.5.1 Nanopartículas de plata biogénicas como agentes antifúngicos

Las AgNPs biogénicas han emergido como una alternativa prometedora en la lucha contra hongos fitopatógenos en plantas (Díaz Acosta & Díaz Acosta, 2019). Estas diminutas estructuras obtenidas a través de síntesis biológica han demostrado un potencial antifúngico significativo (Mussin, 2017). La capacidad de las AgNPs biogénicas para inhibir el crecimiento de hongos como *Fusarium oxysporum* (Dananjaya et al., 2017; A. Kaur et al., 2016; Sathiyabama & Charles, 2015), junto con su impacto positivo en el desarrollo de las plantas, las posiciona como una herramienta innovadora en la protección de cultivos contra

enfermedades fúngicas. Además, su síntesis verde, que implica un proceso respetuoso con el medio ambiente y de bajo costo, las convierte en una opción atractiva para la agricultura sostenible. Estas propiedades hacen que las AgNPs biogénicas sean una promisoría estrategia para el control de microorganismos en plantas, abriendo nuevas posibilidades en la agricultura y la protección de cultivos (Dananjaya et al., 2017; A. Kaur et al., 2016; Sathiyabama & Charles, 2015).

Por ejemplo, Jo et al. evaluaron la actividad antifúngica de AgNPs en dos hongos patógenos de plantas, *Bipolaris sorokiniana* y *Magnaporthe grisea*, demostrando un efecto inhibitorio significativo del crecimiento fúngico mediante ensayos *in vitro* en placas (Jo et al., 2009). Además, los ensayos de inoculación en cámaras de crecimiento permitieron concluir que las NPs reducen significativamente estas dos enfermedades fúngicas en la festuca perenne (*Lolium perenne*) al aplicarse 3 horas antes de la inoculación de esporas (Jo et al., 2009).

En otro estudio, Ibrahim et al. (2020) reportaron el uso de AgNPs sintetizadas a partir de plantas de ajo (*Allium sativum*) contra *Fusarium graminearum* en cultivos de trigo. Han informado que las AgNPs muestran una fuerte inhibición en el crecimiento del micelio, la germinación de esporas, el desarrollo de tubos germinativos y la producción de micotoxinas de *F. graminearum* (Ibrahim et al., 2020).

Además, existen numerosos ejemplos de dichas propiedades en AgNPs sintetizadas por microorganismos como en esta tesis. Por ejemplo, P. Kaur et al. (2018) informaron sobre la biosíntesis de AgNPs a partir de microflora rizosférica aislada del guisante y evaluaron su papel potencial en el control de la marchitez causada por *F. oxysporum f. sp. ciceri* del guisante. Las AgNPs mostraron actividad antifúngica *in vitro* y las semillas de guisante recubiertas con AgNPs mostraron una alta capacidad de germinación (P. Kaur et al., 2018). Por otro lado, Mishra et al. han obtenido AgNPs sintetizadas extracelularmente a partir del sobrenadante del cultivo de la bacteria *Serratia* y han demostrado su eficacia en el manejo de *Bipolaris sorokiniana*, un agente causal de la enfermedad de la mancha foliar en el trigo. Estas AgNPs han exhibido una fuerte actividad antifúngica con una inhibición significativa de la germinación conidial según lo determinado en un bioensayo de hoja (Mishra et al., 2014)

En resumen, se han realizado diversos estudios sobre la capacidad antifúngica de las AgNPs biogénicas. Estos estudios han demostrado su eficacia para detener el crecimiento y la propagación de hongos dañinos en diversos entornos. Además, el CS es otro material de gran relevancia, ofreciendo beneficios multifacéticos, especialmente en ámbitos como la medicina, agricultura y conservación de alimentos. Su papel crucial radica en la preservación y protección contra hongos en estas áreas (Gao & Wu, 2022; A. Wang et al., 2021).

1.6 Quitosano: Un Recurso a considerar contra los Fitopatógenos.

El quitosano (CS), tiene muchos beneficios como un polímero ecológico en la producción agrícola, biomédica y de forraje (A. Wang et al., 2021). Se utiliza para muchos propósitos debido a su alta permeabilidad, ser amigable con el medio ambiente, seguridad para los organismos vivos, bajo costo, y alta solubilidad y biodegradabilidad (A. Wang et al., 2021). El CS es un polisacárido básico, con grupos amino que permiten una fácil funcionalización, ampliando aún más sus aplicaciones (Mohamed & Madian, 2020). Las NPs basadas en CS han tenido aplicaciones en diversas áreas incluyendo la biotecnología, biomedicina, agroalimentaria, otorgando una ventaja competitiva al integrar una tecnología sostenible y ecológica (Gao & Wu, 2022; A. Wang et al., 2021). Por ejemplo, Zimet et al., sintetizaron y caracterizaron NPs de CS (CSNP), utilizando CS comercial de origen animal, y lo emplearon en la encapsulación de compuestos bioactivos para su uso en el control de microorganismos patógenos de alimentos (Zimet et al., 2018, 2019).

En otro estudio reciente, recomiendan el uso de NPs de CS (CSNPs) para aumentar la capacidad de los cultivos y plantas económicamente importantes para hacer frente a diferentes condiciones de estrés, como salinidad, sequía, toxicidad por metales y calor (A. Wang et al., 2021).

El CS puede inhibir el crecimiento de una variedad de hongos filamentosos, bacterias y levaduras debido a la interacción entre los compuestos aniónicos en la pared celular de los microorganismos y los grupos amino (NH_3^+) de las cadenas de CS (Mohamed & Madian, 2020). Además, puede inducir respuestas de resistencia en plantas, por ejemplo, la producción de enzimas que degradan la pared de ciertos fitopatógenos (Mohamed &

Madian, 2020), generando un cambio en el estado fisiológico de la planta de forma tal que sus mecanismos de defensa naturales se ven aumentados, alterando así la actividad de proteínas vinculadas al desarrollo de la patogénesis, entre otros efectos (Mohamed & Madian, 2020). Debido a su naturaleza policatiónica, alta permeabilidad a las membranas biológicas, versatilidad, a su no toxicidad para los seres humanos, biodegradabilidad y amplias actividades antimicrobianas, el CS es una alternativa sustentable y ecológica frente al uso de agroquímicos de síntesis para el control de enfermedades en plantas (Mohamed & Madian, 2020).

En otro estudio, Chookhongkha et al. (2013) examinaron el efecto del CS en el crecimiento micelial de varios hongos (*Rhizopus sp.*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides* y *A. niger*) en semillas de pimiento (*Capsicum sp.*). Además, se ha reportado la actividad antifúngica de diferentes NPs de CS, CS con saponina y CS con cobre a diversas concentraciones (0,001–0,1%). Los resultados destacaron una mayor eficacia inhibitoria con una concentración del 0,1% de CS, logrando inhibir el crecimiento micelial de hongos como *A. alternata*, *M. phaseolina* y *R. solani*. Ing et al. (2012a), evaluaron el efecto antifúngico de NPsCS en *A. niger* y *F. solani*, utilizando NPs preparadas con diferentes concentraciones y pesos moleculares de CS.

Por otro lado, también se ha demostrado el efecto de inducción de resistencia de un CS comercial en el patosistema *Allium cepa* – *Botrytis squamosa*, observándose que el tratamiento de plantas con CS previo a ser inoculadas con el patógeno reduce el desarrollo de la enfermedad (Galeano et al., 2017).

1.7 Nanosistemas plata-CS

Aunque pocos estudios han explorado estos nanosistemas, algunos resultados destacables han surgido. Por ejemplo, P. Kaur et al. (2012) investigaron alternativas para controlar patógenos en garbanzos (*Cicer arietinum*) utilizando NPs de CS y plata. Observaron una notable actividad antifúngica, sobre *Aspergillus flavus*, *R. solani* y *A. alternata*.

Otros trabajos, como el de Mathew & Kuriakose (2013), investigaron NPs de CS funcionalizadas con plata para el control de *A. flavus* y *Aspergillus terreus*. Además, Beyki et al. (2014) estudiaron el efecto de aceite esencial de menta encapsulado en nanogeles de CS

con ácido cinámico contra *A. flavus*, observando un efecto inhibitorio *in vitro* y una mayor vida útil en tomates tratados *in vivo*.

Por lo antes descrito, combinar ambos sistemas de NPs (CS y Ag) se presenta como una interesante alternativa, para que sus propiedades contribuyan de forma sinérgica a conformar nuevos NMs híbridos (Mohamed & Madian, 2020), mediante mecanismos amigables con el medio ambiente y que estos materiales sirvan para disminuir el uso de pesticidas tóxicos, además de contribuir en el manejo integrado de enfermedades en plantas.

En el ámbito de la investigación para el control de patógenos agrícolas, la búsqueda de soluciones efectivas contra fitopatógenos ha llevado a la hipótesis de que las AgNPs biogénicas y el CS podrían ser la clave.

1.8 Antecedentes en Uruguay

En nuestro país se realizó un primer relevamiento de cepas de hongos, aisladas de muestras provenientes de Uruguay, con capacidad de sintetizar AgNPs. Los resultados obtenidos de este relevamiento mostraron que filtrados extracelulares de ocho cepas fúngicas fueron capaces de sintetizar AgNPs bajo las condiciones evaluadas (Sanguñedo et al., 2018). A partir de dicho relevamiento se estudiaron las condiciones de síntesis de AgNPs, su caracterización y estudio de su potencial antimicrobiano, utilizando los hongos *Punctularia atropurpurascens* (Sanguñedo et al., 2019) y *Phanerochaete chrysosporium* (Estevez et al., 2020).

Asimismo, recientemente se realizó la biosíntesis de NPs de plata y cobre a partir de *Trichoderma spp.* bajo diferentes condiciones de reacción (Sanguñedo et al., 2023). Para la caracterización de las NPs biosintetizadas se utilizaron varias metodologías complementarias que permitieron determinar tamaño, distribución, análisis elemental, así como carga y composición del *capping* de las NPs. Su actividad antifúngica fue evaluada frente a fitopatógenos que afectan cultivos de trigo y arroz (Sanguñedo et al., 2023). Los resultados obtenidos permitieron seleccionar una cepa de *Trichoderma harzianum* efectiva en la síntesis de AgNPs (Sanguñedo et al., 2023). Estos trabajos realizados en colaboración entre UDELAR e INIA representaron un primer acercamiento interdisciplinar en el uso de

Desarrollo de NMs de CS y plata para el control de fitopatógenos.

Nanobiotecnología para enfrentar desafíos con potencial aplicación en cultivos de nuestro país (Sanguineto et al., 2023).

Por otro lado, otro antecedente relevante para esta tesis son los trabajos realizados en la síntesis y caracterización de NPs de CS, y en sus diferentes aplicaciones. Se realizó la encapsulación de compuestos bioactivos para su uso en el control de microorganismos patógenos de alimentos, como *Listeria monocytogenes* en carne (Zimet et al., 2018, 2019).

Con estos antecedentes, en esta tesis se plantea el desarrollo de nanosistemas con propiedades antifúngicas, dirigido a contribuir al manejo integrado de enfermedades en cultivos de importancia en Uruguay, tales como el trigo, arroz y cebolla. Este estudio tiene como objetivo principal la creación de nanosistemas a base de plata y CS con capacidad antimicrobiana contra patógenos de relevancia en la agricultura. Los objetivos específicos abarcan la síntesis y caracterización de las NPs, la evaluación de diferentes condiciones para la síntesis de nanohíbridos (NHs), así como la determinación de su actividad antifúngica *in vitro* frente a microorganismos perjudiciales para estos cultivos. Además, se busca evaluar el efecto de estos nanosistemas en ensayos con semillas, ofreciendo un paso prometedor hacia soluciones innovadoras en la protección de los cultivos agrícolas.

2. Hipótesis.

A partir de AgNPs biogénicas y NPs de CS se pueden desarrollar nanosistemas con propiedades antifúngicas con aplicaciones en el control de fitopatógenos de trigo, arroz y cebolla.

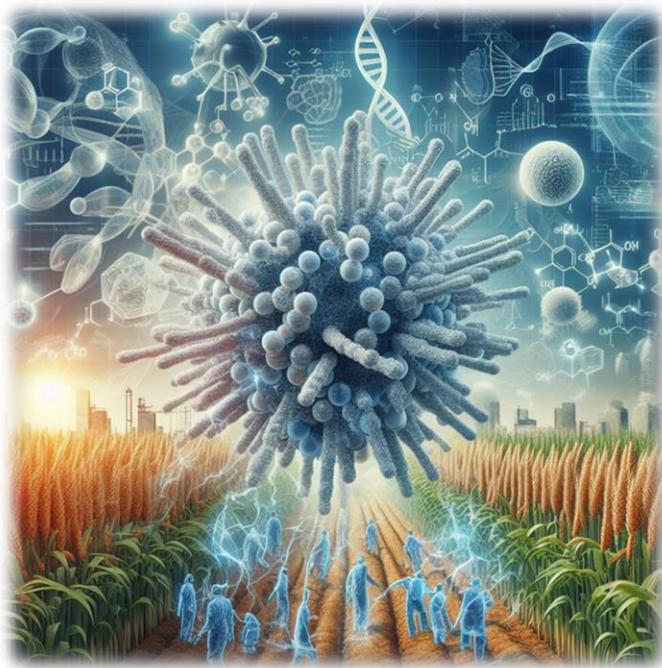
3. Objetivos.

3.1 *Objetivo general.*

Desarrollar nanosistemas a base de plata y quitosano con actividad antimicrobiana frente a patógenos de interés en el sector agrícola.

3.2 *Objetivos específicos.*

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de quitosano y de plata.
2. Evaluar distintas condiciones de síntesis de nanohíbridos quitosano-plata y caracterizarlos.
3. Determinar la actividad antifúngica in vitro de las AgNPs, CSNPs y de los nanohíbridos CS-Ag, frente a microorganismos fitopatógenos de plantas de arroz, trigo y cebolla.
4. Evaluar efecto de las AgNPs, CSNPs y de los nanohíbridos CS-Ag en ensayos en semilla.



Sección II

4. Materiales y métodos

“La agricultura ecológica es una apuesta por la calidad de los alimentos y la salud de las personas”.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Los microorganismos utilizados para la biosíntesis de las AgNPs fueron los hongos *Phanerochaete chrysosporium* (cepa CCMG12G) y *Punctularia atropurpurascens* (cepa H2126) provenientes de la Colección de Cepas de la Cátedra de Microbiología (CCMG) de la Facultad de Química (UDELAR, Uruguay), y *Trichoderma harzianum* (cepa ILB 395) de la colección de INIA Las Brujas (aislamiento proporcionado por la Dra. Sandra Lupo (UDELAR, Uruguay).

Los patógenos de arroz; *Rhizoctonia oryzae-sativae* (cepa ILB 428), *Sclerotium oryzae* (cepa ILB 425) y *Pyricularia oryzae* (cepa Po290), fueron proporcionados por el Dr. Sebastián Martínez (INIA, Uruguay) y el hongo patógeno de trigo: *Fusarium graminearum* (cepa 02020) fue proporcionado por la Dra. Silvia Pereyra (INIA, Uruguay). Además, se evaluó el patógeno de cebolla: *Botrytis squamosa* (UR05), aislamiento de Uruguay realizado por el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía (UDELAR). Finalmente, los hongos *Aspergillus niger* (ATCC 16404) y *Penicillium expansum* (14S) provienen de la colección CCMG de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química (UDELAR, Uruguay).

4.2 Métodos

4.2.1. Síntesis y purificación de los NMs

Síntesis de nanopartículas de plata biogénicas a partir de hongos.

La síntesis de AgNPs se realizó empleando métodos biológicos a partir de hongos. Para ello se emplearon tres cepas de hongos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens* y *Trichoderma harzianum*, que fueron seleccionados en trabajos previos por el grupo por producir AgNPs antimicrobianas (Sanguiniedo et al., 2018, 2023). La metodología (Figura 5) consistió en realizar los cultivos en placas con Potato Dextrose Agar (PDA) de cada uno de los hongos mencionados anteriormente. Luego, se tomó dos discos de 90 mm de diámetro de los cultivos y se inocularon en 100 mL de medio líquido Potato Dextrose Broth (PDB, OXOID). Se procedió a incubar a 28°C con una agitación constante de

150 rpm durante 72 horas. Al transcurrir el tiempo, se obtuvo micelio fúngico del cultivo líquido, el cual se filtró y se lavó con agua destilada estéril. Seguidamente, se suspendieron los micelios fúngicos húmedos en agua destilada esterilizada (0,1 g/mL) y se incubaron con agitación en un agitador orbital a 150 rpm, durante 24 h. Luego, el filtrado libre de células se recogió filtrando esta suspensión a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,45 μm . Finalmente, se agregaron 50 mL del filtrado libre de células a 50 mL de nitrato de plata (AgNO_3) 5 mM y se incubaron en la oscuridad, junto con el control (filtrado sin adición de AgNO_3).

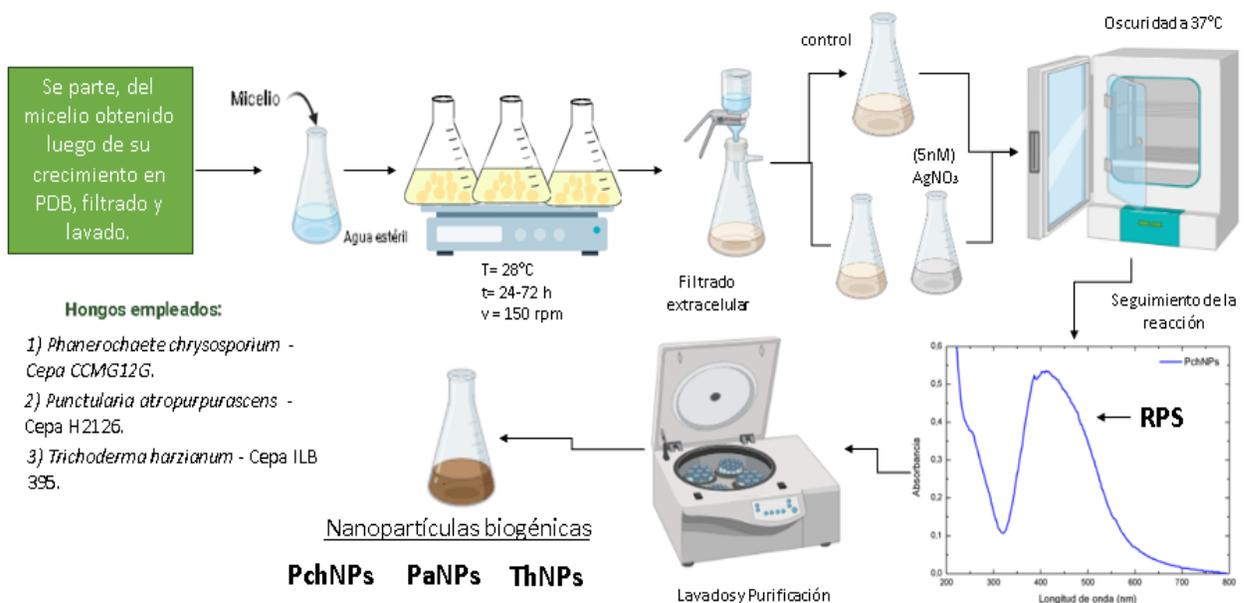


Figura 5. Metodología de síntesis de AgNPs biogénicas a partir de hongo. Creado con Biorend.com.

El progreso de la biosíntesis se monitoreó registrando espectros de absorción (incluyendo el control) entre 200 y 800 nm y midiendo el aumento en la absorción en la longitud de onda, pico correspondiente a la RPS de las NPs sintetizadas a lo largo del tiempo. Cuando se dejó de observar aumento en el pico de absorción máximo de las NPs metálicas, la reacción culminó, por lo que se procedió a centrifugar las muestras a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las NPs a partir de *Phanerochaete chrysosporium* (PchNPs), *Punctularia atropurpurascens* (PaNPs) y *Trichoderma harzianum* (ThNPs) fueron purificadas, lavándolas dos veces con agua destilada, centrifugándolas a 10000 rpm durante 10 min cada vez, y finalmente fueron resuspendidas en agua destilada estéril.

Síntesis de nanopartículas de CS (CSNPs).

La síntesis de NPs basadas en CS (CS) puede llevarse a cabo por diversos procesos tales como el entrecruzamiento iónico (gelificación iónica), nanoprecipitación, microemulsión, coacervación y electroaspersión. El método más utilizado es el entrecruzamiento iónico, usando tripolifosfato de sodio (TPP) como agente reticulante, debido a que es un proceso amigable con el medio ambiente, económico, reproducible y fácil de desarrollar. Además, la fabricación de estos sistemas nanoparticulados se realiza bajo condiciones suaves de entrecruzamiento, por lo que los componentes bioactivos no pierden actividad biológica. En nuestro caso, se utilizó el método de gelación iónica optimizado por el grupo (Zimet et al., 2018). La metodología (Figura 6) consistió en preparar soluciones de CS (bajo peso molecular de 50 a 190 kDa, $\geq 75\%$ desacetilado, de Sigma-Aldrich) en ácido acético del 0,1% al 1% (v/v) y soluciones de TPP en agua (1,6 mg/mL). Se agregó gota a gota la solución de TPP a la solución de CS en agitación, se ajustó el pH con una solución de NaOH (entre 4 y 6), manteniendo la solución en agitación constante a temperatura ambiente. Luego de obtenidas las NPs se separaron por centrifugación (12000 rpm por 10 minutos), se lavaron dos veces y resuspendieron en agua desionizada. Además, para lograr una mejor homogenización del CS en la solución, se variaron algunas condiciones, como: concentración del ácido acético y tiempo de homogenización (ver Tabla 1), estas variaciones permitieron disminuir los tamaños de partícula promedio y obtener NPs con baja polidispersidad.

Tabla 1. Condiciones de reacción para sintetizar las NPs de CS.

Síntesis	Acido Acético (%)	CS (mg/mL)	TPP (mg/mL)	Tiempo de homogenización (min)
CSNPs A	0,4	2,4	1,6	30
CSNPs B	0,4	2,4	1,6	1440 (overnight)
CSNPs C	1	2,4	1,6	1440 (overnight)

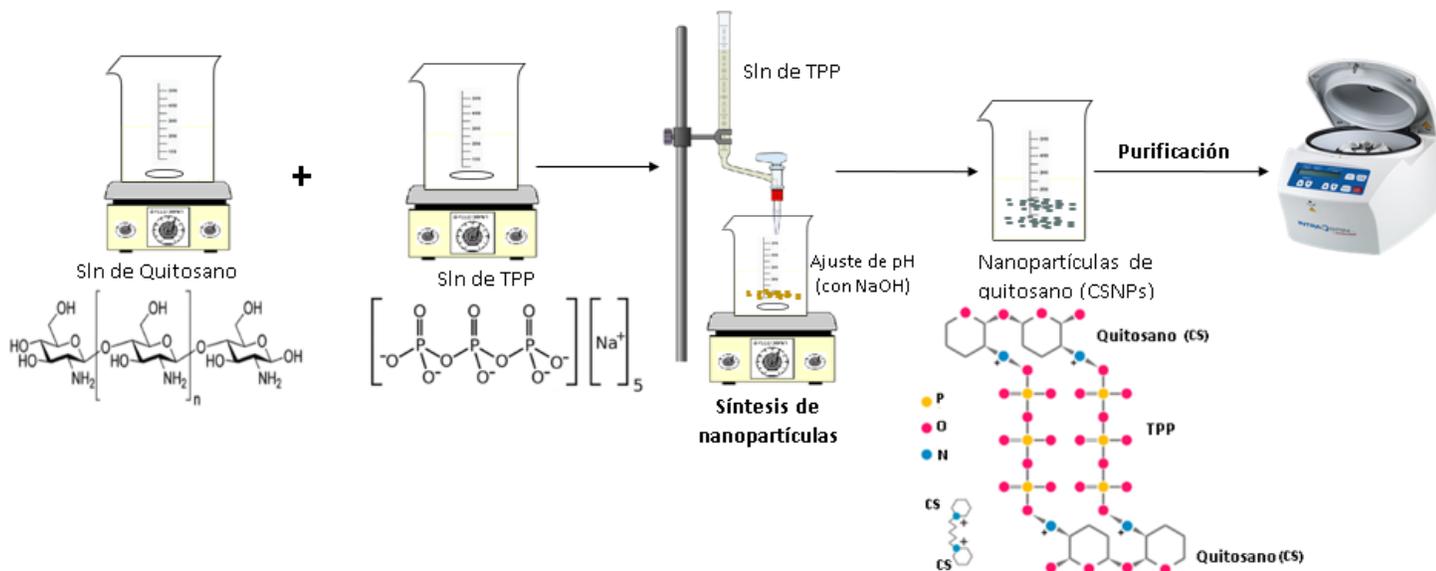


Figura 6. Metodología de síntesis de CSNPs mediante gelación iónica (Wu et al. 2020; Zimet et al. 2018).

Síntesis de NHs CS-plata (NHs).

La síntesis de los NHs (Figura 7) de CS – plata se realizaron a partir de soluciones de CS a diferentes concentraciones de partida (1,2; 2,4 y 4,8 mg/mL) y NPs biogénicas (PaNPs, ThNPs y PchNPs) con concentraciones de 0,26 µg/mL. Para ello, se prepararon las soluciones de CS, dejándolas en agitación continua por 24 horas. Al concluir el tiempo, se procedió a añadir gota a gota las AgNPs biogénicas a las soluciones de CS (relación volumétrica 1:1) y se dejaron en agitación por 5 horas. Luego de la síntesis los NHs fueron centrifugados a 10000 rpm por 20 min, lavados y resuspendidos en agua. En la Tabla 2, se muestran las condiciones de síntesis realizadas de los NHs.

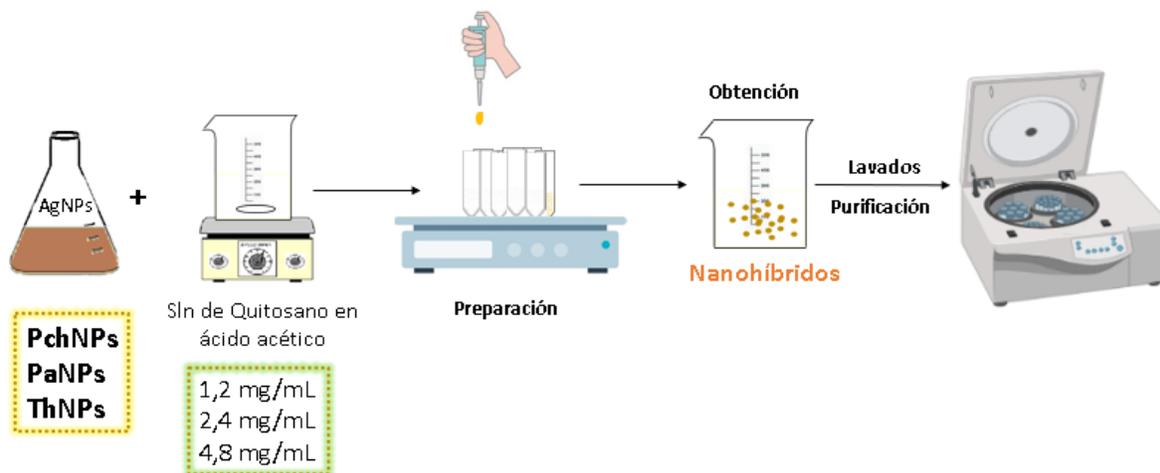


Figura 7. Síntesis de los NHs a partir de NPs biogénicas y CS.

Tabla 2. Condiciones de síntesis de los NHs de CS-Ag.

Síntesis	Acido Acético (%)	Sln. CS de partida (mg/mL)	Relación vol. CS:AgNPs	AgNPs biogénicas (µg/mL)
NH-Pch1	1	1,2		
NH-Pch2	1	2,4	1:1	0,26 (PchNPs)
NH-Pch3	1	4,8		
NH - Pa1	1	1,2		
NH - Pa2	1	2,4	1:1	0,26 (PaNPs)
NH - Pa3	1	4,8		
NH - Th1	1	1,2		
NH - Th2	1	2,4	1:1	0,26 (ThNPs)
NH - Th3	1	4,8		

4.2.2 Caracterización de los NMs

Espectroscopía UV-visible

Permitió caracterizar las AgNPs biogénicas y a los NHs, mediante la detección de la banda a 400-450 nm correspondiente a la RPS de las AgNPs, con la finalidad de monitorear la formación de las NPs y su estabilidad. Para ello, se empleó el espectrofotómetro UV/Visible Jenway 6715, en el rango de 250-800 nm.

Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Electroforesis Doppler Láser (Potencial Z)

El diámetro hidrodinámico y las cargas de las NPs y de los NHs, se determinaron mediante DLS y dispersión de luz electroforética (ELS), respectivamente, utilizando un analizador de tamaño de partícula/potencial zeta. Para ello, se empleó el equipo Nano-Zetasizer, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK. Las muestras se prepararon a pH 6 en agua desionizada y los análisis se realizaron a 25 °C, viscosidad de 0,8872 cP, RI de 1,33 y un ángulo de retrodispersión de 173°. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados del tamaño de partícula y del potencial zeta se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Los resultados fueron tratados utilizando el software Malvern Zetasizer.

Difracción de Rayos X (XRD)

Se determinaron las fases cristalinas de los NMs por XRD. Para ello las muestras fueron congeladas (-70 °C) y liofilizadas en el equipo Christ modelo GAMMA 1- 16 LSC a -55 °C y 0,021 mbar de temperatura y presión, respectivamente.

Los patrones de difracción de rayos X en polvo se obtuvieron con un difractómetro de rayos X Rigaku Miniflex 600-C que opera en una geometría $\theta - 2\theta$ Bragg-Brentano. Estaba equipado con un generador de rayos X para radiación Cu $K\alpha$, $\lambda = 1,5419 \text{ \AA}$, que operaba a 40 kV, 15 mA y utilizaba un detector D/tex Ultra2 1D. Las mediciones se llevaron a cabo en modo de escaneo en un rango de 2θ de 3° a 70° con un tamaño de paso de $2\theta = 0,02^\circ$ con una velocidad de 20°/min. Las NPs y los NHs se analizaron en forma de polvo seco.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía de dispersión de energía (EDS)

La Microscopía Electrónica de Transmisión permitió visualizar las morfologías y medir la distribución de tamaños de los NMs. Para ello se resuspendió la muestra en etanol 95% y se secó. Posteriormente se observó con un microscopio electrónico de alta resolución (HR-TEM) JEOL JEM 2100 de 200 kV de tensión de aceleración (servicio de Microscopía de CURE Rocha, UDELAR), empleando una rejilla de cobre. Además, se estudió la composición química elemental con una sonda EDS de rayos X en la superficie de las NPs. Luego, los tamaños de las NPs se determinaron mediante análisis de las imágenes por ambas microscopías electrónicas utilizando el software Image J. También se empleó un método práctico y eficiente para analizar características estructurales a partir de micrografías HR-TEM (realizadas en el párrafo precedente) y así para proponer las estructuras cristalinas presente en los NMs (Obeso–Estrella et al., 2022). El método general consistió en tres pasos: 1) pretratamiento de la micrografía (Figura 8), 2) medición de distancias planares (Figura 9) y 3) identificación de estructuras.

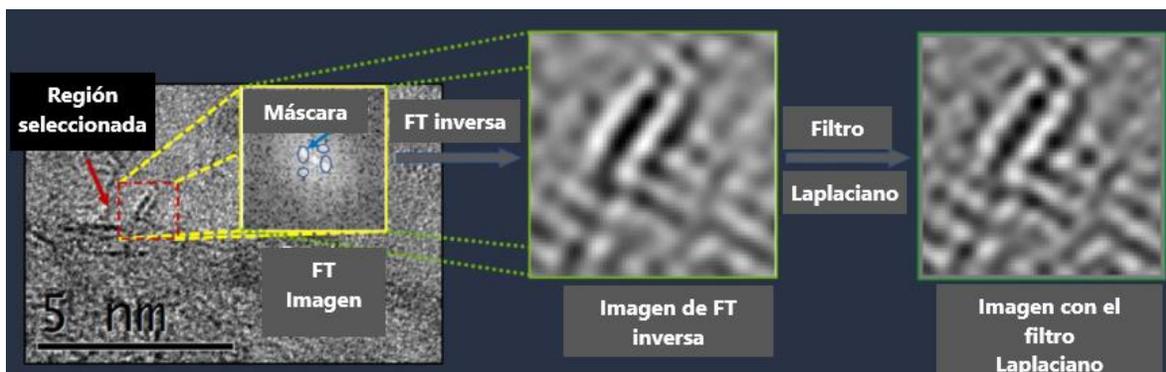


Figura 8. Proceso de pretratamiento de filtrado de micrografías de una región seleccionada para análisis (Obeso–Estrella et al., 2022).

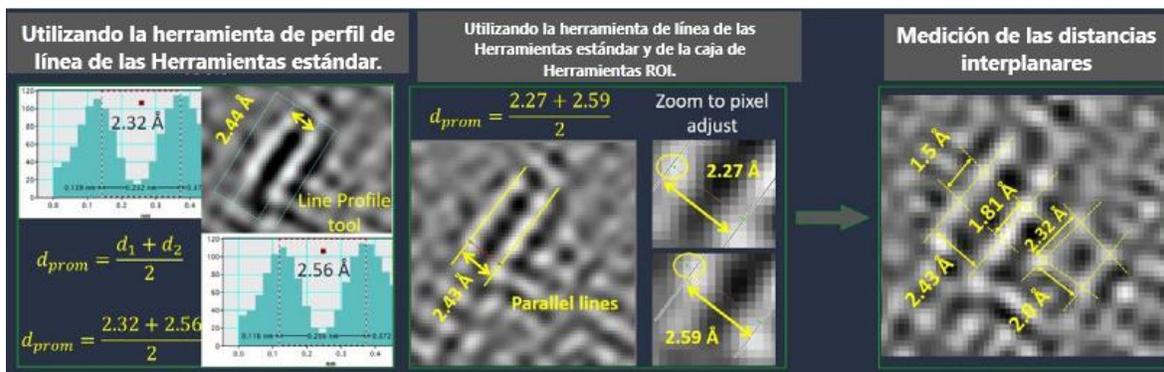


Figura 9. Proceso para discriminar la estructura basándose en los datos medidos y extraídos de la base de datos (Obeso–Estrella et al., 2022).

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier brinda información sobre la naturaleza de los grupos funcionales presentes en los NMs. Para ello, se empleó un espectrofotómetro de reflectancia total atenuada de transformada de Fourier infrarrojo (ATR-FTIR) (SHIMADZU IRSpirit con una placa de cristal de rendimiento Pike Diamond/KRS-5 HS). Los picos principales se expresaron en cm^{-1} . ATR nos permite usar las muestras directamente en estado sólido o líquido sin necesidad de matriz de KBr o yodo de lugol. Específicamente, empleamos 20 mg de los NMs, colocando la muestra en la placa y la punta se posicionó de tal manera que la tensión superficial de la muestra cubriera homogéneamente la placa de diamante. Se adquirieron 20 escaneos a una resolución del instrumento de 4 cm^{-1} en el rango espectral entre 400 y 4000 cm^{-1} debido al corte de frecuencia del elemento de reflexión interna (IRE) ATR-FTIR utilizado.

4.2.3. Actividad antifúngica in vitro de los NMs

Luego de sintetizar las AgNPs biogénicas, CS, los NHs y caracterizar los diferentes sistemas, se procedió a evaluar la actividad antifúngica de los NMs frente a fitopatógenos de interés en el sector agrícola. Para ello, se empleó un método estandarizado, como la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima mediante técnica de microdilución en caldo en microplacas de titulación de fondo plano (NUNC-Thermo Scientific®) (CLSI 2017), frente a

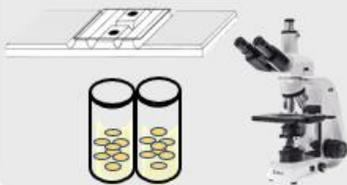
hongos que están frecuentemente presentes en semillas (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) y el fitopatógeno de arroz *Pyricularia oryzae*. Además de los NMs se incluyeron en la evaluación los siguientes antifúngicos: solución de CS y fungicidas comerciales Tebuconazol y Metconazol. El ensayo consistió (Figura 10) en realizar diluciones seriadas de los NMs antifúngicos a evaluar en caldo Mueller-Hinton Broth – MHB (HIMEDIA®). Las concentraciones de partida de los nanomateriales PchNPs, PaNPs, ThNPs fueron de 0,4 µg/mL, de las CSNPs de: 0,8 mg/mL y de los nanohíbridos NHPch1, NHPch2, NHPch3, NHPa1, NHPa2, NHPa3, NHTh1, NHTh2, NHTh3, fueron alrededor de 0,4 µg/mL. Realizadas las diluciones, en los pocillos de la microplaca se sembraron además suspensiones de los fitopatógenos esporulados, con una concentración de 1×10^4 esporas/mL en suero fisiológico con *Tween* 20. En los ensayos se incluyeron controles de esterilidad y crecimiento (caldo de cultivo con y sin la suspensión de los microorganismos). Por último, se incubaron por 4 días a 28 °C. Se determinó la concentración mínima de antifúngico que provocó una inhibición visible del crecimiento microbiano.

También se determinó el efecto de los NMs sobre el crecimiento del micelio de los fitopatógenos no esporulados de plantas de arroz (*Sclerotium oryzae* y *Rhizoctoria oryzae - sativae*) y de cebolla (*Botrytis squamosa*). Para estos ensayos (Figura 11) 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 tres concentraciones diferentes (diluciones al medio) de solución de CS y de los NMs, se incubaron durante 3 días a 28 °C. Además, se incluyeron cultivos de control de 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 NPs representó el 100 % de crecimiento (0 % de inhibición). La inhibición producida por cada concentración de NPs se expresó en porcentaje, en comparación con el control. Por último, el valor de CE50 (la concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento fúngico) se estimó mediante regresión lineal del valor de inhibición relativa transformado por probit y el log10 de la concentración del antifúngico (Tian et al., 2019).

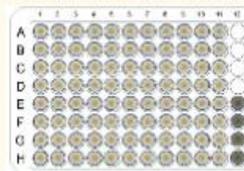
Es importante mencionar que todos los ensayos de actividad antifúngica se realizaron por triplicado.

ENSAYO EN CALDO

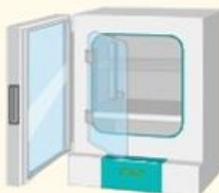
1 Preparación de la suspensión del microorganismo- suspensión de esporas de hongos.



2 En cada pocillo se agrega:
a. Concentraciones conocidas de los nanomateriales (diluciones seriadas).
b. Caldo de cultivo.
c. Suspensión de Microorganismos.
d. Control Crecimiento: Caldo + inóculo.
e. Control Esterilidad: Caldo sin inóculo.



3 Incubación a Temperatura y tiempo apropiado.



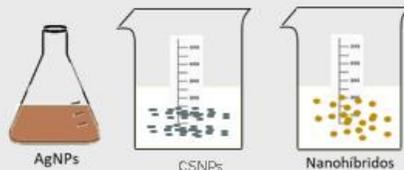
4 Observación de crecimiento o inhibición a las distintas concentraciones de los nanomateriales.



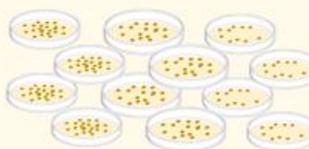
Figura 10. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los NMs.

ENSAYO EN MEDIO SÓLIDO.

1 Preparación de distintas concentraciones de los nanomateriales (0, 1, 1/2, 1/4 y 1/8).



2 Incorporación de los nanomateriales en Potato Dextrose Agar (PDA).



3 Siembra de los discos de micelio de fitopatógenos en cada una de las placas. Incubación de las placas por 3 días a 28°C.



4 Medición de los diámetros de crecimiento de los micelios.



Figura 11. Evaluación de la actividad antifúngica de los NMs en agar incorporado.

4.2.4 Evaluación del efecto de los NMs en la germinación de semillas de trigo y arroz.

Estos ensayos tuvieron como finalidad evaluar el efecto de los NMs sobre la germinación de semillas de trigo y arroz (Sanguñedo et al., 2023). Para ello, se realizaron ensayos *in vitro* en placas (Figura 12), sembrando en placas de Agar agua, semillas con y sin tratamiento de los nanosistemas. Las semillas de arroz (*Oriza sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*) de los cultivares comerciales INIA Tacuarí e INIA Génesis 4.33, respectivamente, fueron suministradas por el Dr. Eduardo Abreo (INIA Las Brujas).

El ensayo consistió en remojar las semillas en agua destilada por 10 minutos, para hidratarlas. Luego, se escurrieron, secaron y se volvieron a sumergir en soluciones de los NMs durante 2 horas. Las concentraciones de NMs empleadas fueron seleccionadas de acuerdo a los ensayos de actividad antifúngica: AgNPs y NH CS-AgNPs $\sim 0,1$ ug/ml, CSNPs 0,8 mg/ml. En los ensayos se incluyeron controles de semillas tratadas sólo con agua destilada (blanco). Culminado el tiempo, se procedió a escurrirlas, secarlas con papel absorbente y sembrarlas en placas de Petri con Agar agua. En cada placa se colocaron 10 semillas y se realizaron tres réplicas por tratamiento. Las placas con semillas fueron incubadas durante 6 días a 28 °C. Las semillas con coleóptilos y raíces de más de 2 mm se calificaron como positivas para la prueba de germinación.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y se determinaron los promedios, desviación 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, 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).

ENSAYO *IN VITRO* EN PLACAS



Figura 12. Tratamiento de semillas de arroz y trigo. Creado con Biorend.com.

4.2.5. Evaluación de inducción de resistencia a *Botrytis squamosa* de los NMs

Los experimentos realizados con plantas (tratamientos con inductores, inoculación del patógeno, incubación) que se describen a continuación se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Regional Sur de Facultad de Agronomía (Udelar) bajo la dirección del Dr. Guillermo Galván y la supervisión directa del Lic. Pablo Galeano.

Se realizaron ensayos *in vivo* en plantas de cebollas infectadas con el fitopatógeno *B. squamosa*. La evaluación consistió en utilizar NMs (CSNPs 2,4 mg/ml, NHPch 0,2 µg/ml) y solución de CS (CS–Sigma 2,4 mg/ml y CS en Biorend® 0,5 mg/ml) como inductores de resistencia. Se utilizaron plantas adultas de cebolla (variedad Regia) de 160 a 210 días contando desde la siembra, según el ensayo. Las plantas se produjeron en almácigos y se trasplantaron a macetas en invernáculo hasta su uso. Tres días antes de ser inoculadas con el patógeno (*B. squamosa*), las plantas adultas fueron tratadas con los inductores por asperjado de hojas (5-6 plantas por tratamiento). La inoculación se realizó por asperjado con una suspensión de conidios (1×10^4 esporas/ml). El asperjado fue un rociado uniforme (con

un rociador) de los inductores y del inóculo, sobre las plantas. Se evaluaron cuatro tratamientos (arreglo factorial 2 x 2): plantas sin inductor y sin inocular; con inductor y sin inocular; sin inductor e inoculadas; con inductor e inoculadas. Se mantuvo en cámara de crecimiento (17 °C, 100% humedad relativa, 10 h diarias de luz) hasta evaluación de síntomas y toma de muestras luego de 8 días de inoculación (Figura 13). La toma de muestra consistió en tomar las hojas 3 y 4 de cada planta, al 8vo día después de la inoculación.

Para la evaluación de síntomas se analizó el área afectada utilizando el programa de imágenes Image J. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA y Test de Tukey.

1 Tratamiento a las plantas de cebolla con nanosistemas y quitosano.



2 Se dejan en la cámara de crecimiento durante tres días.



3 Se prepara una suspensión de conidios.



4 Se inoculan las plantas con el patógeno y se deja en la cámara por 8 días.



5 Toma de muestras y evaluación de los síntomas.



Figura 13. Tratamiento *in vivo* de los NMs en plantas de cebolla.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Síntesis y caracterización de los NMs

5.1.1. Resultados

Síntesis de nanopartículas biogénicas

Las AgNPs biogénicas fueron sintetizadas por la reacción entre el nitrato de plata y los filtrados extracelulares (agentes reductores y estabilizantes) de los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens* y *Trichoderma harzianum*, a 28 °C por 48 h. El producto de la reacción se tornó marrón-amarillento, este color se debe a la excitación de las vibraciones del plasmón superficial en las NPs de metal (Mulvaney, 1996). Esta observación importante indica que la reducción de los iones de Ag^+ ocurre. La formación de las AgNPs reducida en la solución coloidal fue monitoreada mediante el análisis espectral UV-visible.

El espectro ultravioleta-visible es una técnica importante para determinar la formación de NPs metálicas, mediante la aparición del pico de RPS. Los espectros UV-Vis registrados de las síntesis con *P. chrysosporium*, *P. atropurpurascens* y *T. harzianum*, en diferentes intervalos de tiempo de reacción se muestran en la Figura 14. Los espectros muestran que la banda de RPS de las AgNPs ocurre a 420 nm. En la Figura 14, se observa una banda de absorción a 260 nm que es claramente visible y se puede atribuir a excitaciones electrónicas en los residuos de triptófano y tirosina de las proteínas del capping. (Fayaz et al., 2010).

Finalizada la síntesis, las NPs fueron centrifugadas, lavadas a las 48 horas de reacción, para quitar el exceso de extracto y reactivos, por último, fueron resuspendidas en agua. En todos los casos, las NPs resultaron estables a dicho proceso de purificación (curva roja en los espectros), se resuspendieron correctamente en agua destilada y no presentaron alteraciones en el pico de RPS.

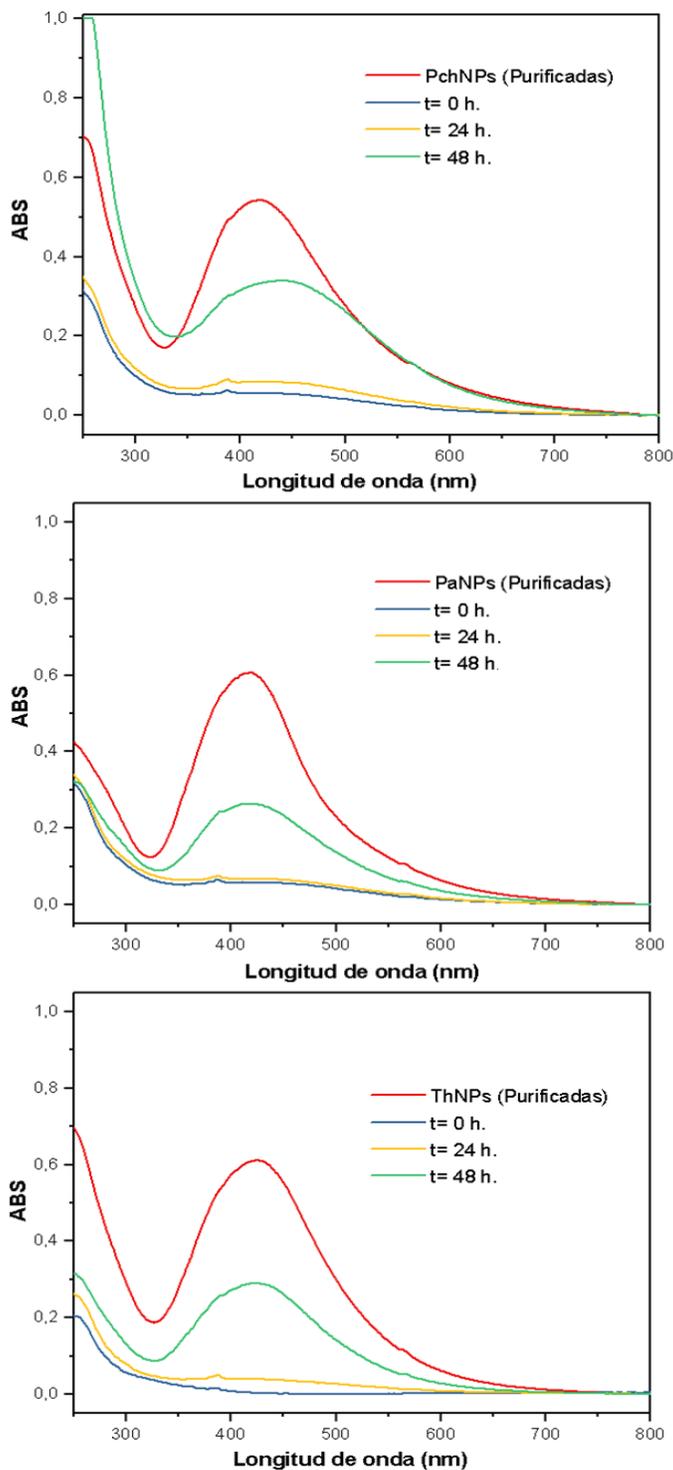


Figura 14. Espectros de absorción de UV-vis de las NPs biogénicas (PchNPs, PaNPs y ThNPs). Donde las curvas azules es la medición a tiempo de reacción (t) 0 h, las curvas amarilla a t= 24 h, la verde a t= 48 h de reacción y las curvas roja son las medidas de las NPs luego de haber sido centrifugadas, lavadas y resuspendidas en agua.

Síntesis de nanopartículas de CS (CSNPs).

Como se describió en Métodos, se evaluaron 3 condiciones de preparación de la solución de CS: tiempo de homogenización (CSNPs A y B) y concentración de la solución de ácido acético (CSNPs C). Cuando se le añadió la solución de TPP, la solución clara de CS se volvió translúcida, indicando así la formación de las NPs de CS, como previamente reportado por nuestro grupo en la síntesis de CSNP (Zimet et al., 2018). Los resultados de las condiciones que se muestran en este estudio, es en función de la homogenización y dilución completa del quitosano en agua. Por ejemplo, se incrementó el tiempo de homogenización de de 30 min a 24 h, ya que se observó que, a 30 min, 4 h, 8h y 10 h, no hubo cambio en la homogenización de la solución. Lo mismo paso con las concentración de ácido acético.

Síntesis de nanohíbridos de CS-plata.

Los NHs fueron sintetizados incorporando las NPs biogénicas previamente sintetizadas (PchNPs, PaNPs y ThNPs) a soluciones de distintas concentraciones de CS, como se describió en Metodología. Los espectros UV-Vis de los NHs fueron registrados en el rango de 200 a 800 nm, como se ilustra en las Figura 15, Figura 16 y Figura 17, correspondientes a los NHPch, NHPa y NHTh, respectivamente. En cada uno de los casos, se observó un pico de longitud de onda máximo a 420 nm, que es característico de las AgNPs, no observándose cambios significativos en los espectros para ninguno de los NHs.

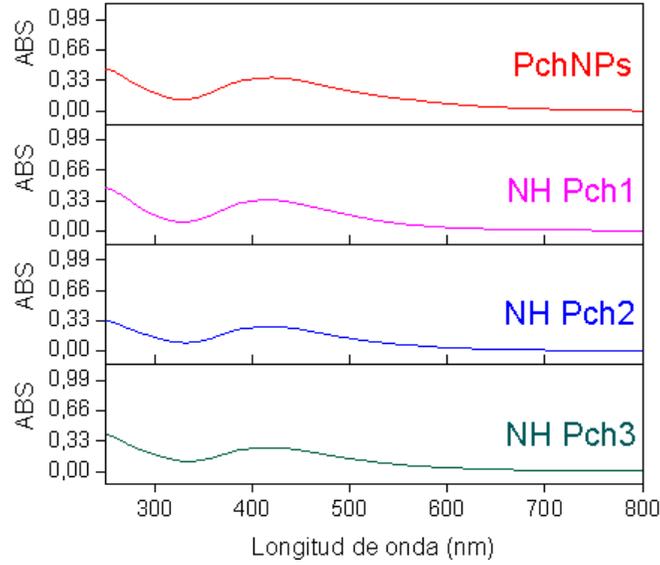


Figura 15. Espectros de absorción de UV-vis de NHs a partir de PchNPs, donde NHPch1, NHPch2 y NHPch3, corresponden a concentraciones de partida de CS 1,2; 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.

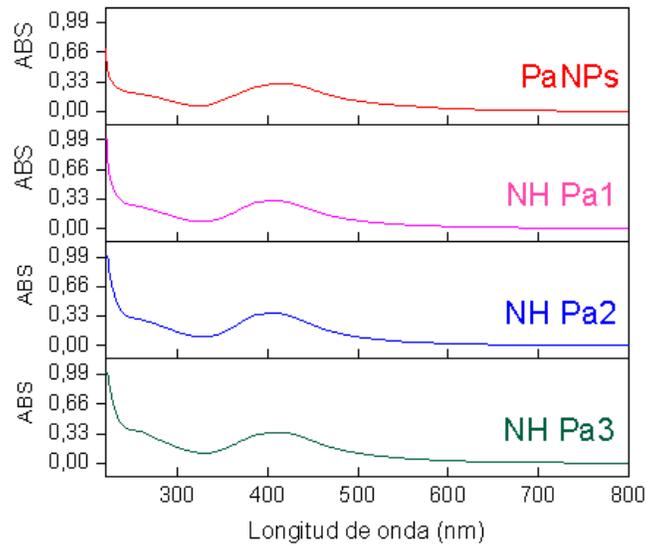


Figura 16. Espectros de absorción de UV-vis de NHs a partir de PaNPs, donde NHPa1, NHPa2 y NHPa3 corresponden a concentraciones de partida de CS 1,2; 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.

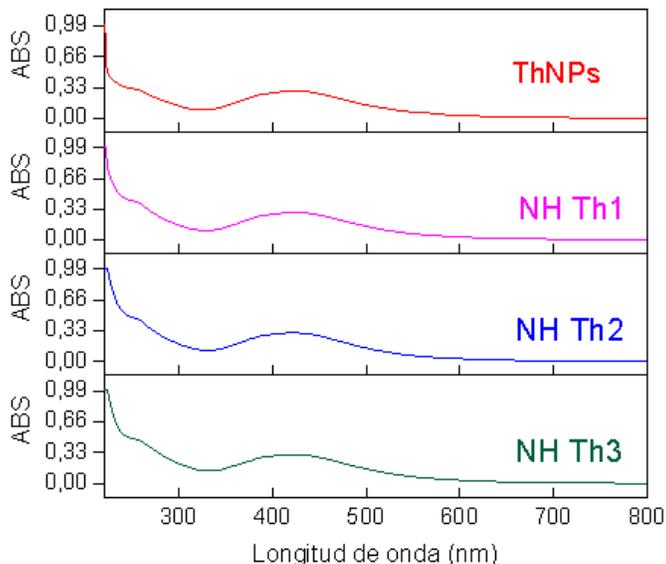


Figura 17. Espectros de absorción de UV-vis de NHTs a partir de ThNPs, donde NHTh1, NHTh2 y NHTh3, corresponden a concentraciones de partida de CS 1,2; 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.

Caracterización de los NMs

Luego de la purificación los NMs fueron caracterizados por técnicas complementarias: Dispersión de luz dinámica, Electroforesis Doppler Láser (potencial Z), XRD y FTIR.

➤ Análisis por Dispersión de Luz Dinámica.

AgNPs biogénicas

La medición de DLS se llevó a cabo para obtener el tamaño hidrodinámico de las AgNPs biogénicas (Figura 18). Los diámetros hidrodinámicos promedio estuvieron entre 20 a 25 nm, con un valor de índice de polidispersidad alrededor de 0,3. El perfil de DLS monomodal y sus diámetros hidrodinámicos promedios, sugieren que las AgNPs están dispersas principalmente como partículas individuales sin agregación.

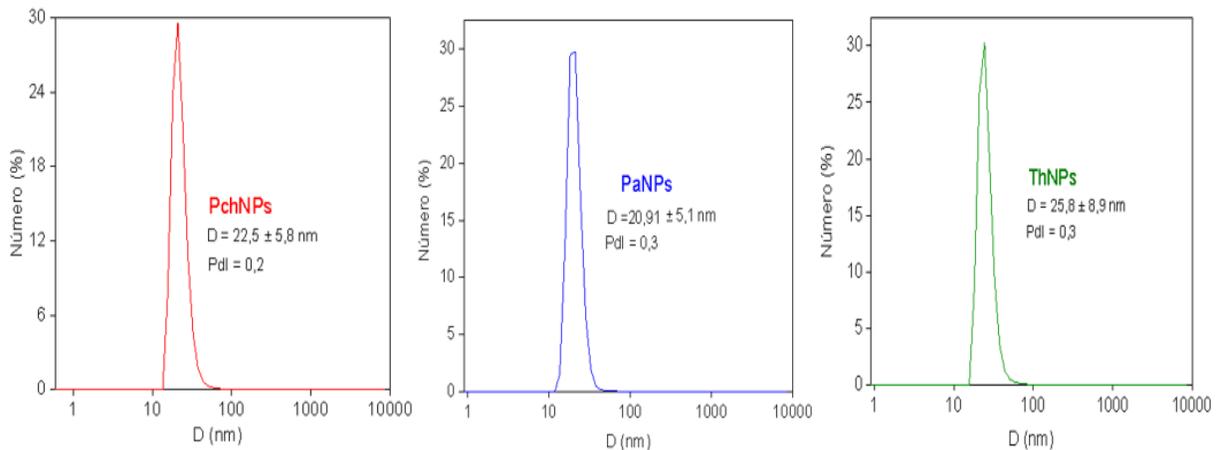


Figura 18. Curvas de DLS de las AgNPs biogénicas sintetizadas.

CSNPs

En la Figura 19, se muestran los diámetros promedio de las NPs de CS, que fueron de 69,9 nm, 151,1 nm y 96,6 nm para las tres condiciones de síntesis evaluadas, mostrando una distribución de tamaño de partícula estrecha y favorable. El tamaño de partícula podría estar relacionado con los grupos $-NH_2$ disponibles en las cadenas poliméricas del CS, lo que conduce a una repulsión molecular más fuerte, lo que hace que las cadenas poliméricas de CS se estiren y resulte en tamaños de partícula mayores (Jampafuang et al., 2019). Los valores de PDI (índice de polidispersidad) de las NPs de CS fueron de 0,4, 0,3 y 0,1, en las tres condiciones evaluadas. En forma general se puede decir que en la síntesis de nanopartículas se buscan PDI por debajo de aproximadamente 0,4, debido a que valores de PDI mayores indican alta polidispersidad, siendo una indicación de agregación (Jampafuang et al., 2019). Los resultados muestran que a medida que se realizaron ajustes en el tiempo de agitación de las soluciones de partida de CS (condición B) y la concentración de ácido acético (condición C), se logró obtener tamaños de partículas más homogéneos con menores índices de polidispersidad. La condición A, corresponde a la condición de partida obtenida de estudios previos (Zimet et al., 2018).

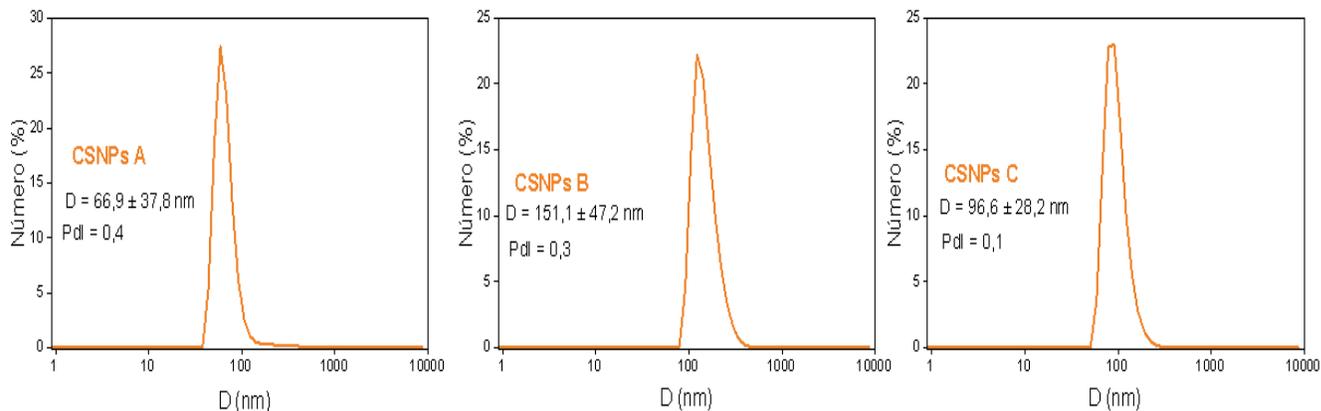


Figura 19. Diámetros hidrodinámicos promedios de las CSNPs, determinados por DLS.

NH CS-AgNPs

Para el sistema de NHs preparados utilizando PchNPs de partida (Figura 20), sus tamaños de diámetros se mantuvieron a pesar del incremento en la concentración de CS ($143,6 \pm 91$ nm, $142,0 \pm 77$ nm y $115,9 \pm 70$ nm, correspondiente a NHPch1, NHPch2 y NHPch3, respectivamente).

En la Figura 21, se muestran los resultados de las mediciones de tamaño para los NHs sintetizados utilizando PaNPs, los mismos pertenecen a los NHPa1 (1,2 mg/ml CS), NHPa2 (2,4 mg/ml CS) y NHPa3 (4,8 mg/ml CS). Se observó que los diámetros aumentaron a mayor concentración de CS: $114,8 \pm 73$ nm, $217,1 \pm 105$ nm y $315,9 \pm 151$ nm, respectivamente.

Finalmente, en la Figura 22, se muestran los diámetros hidrodinámicos de los NHs preparados a partir de ThNPs, donde se puede apreciar que sus tamaños fueron $184,6 \pm 99$ nm, $239,5 \pm 148$ nm, $571,4 \pm 234$ nm, para los NHTh1, NHTh2 y NHTh3, respectivamente. Se observa, al igual que con los NHPa, que a medida que se incrementa la concentración de CS existe un incremento en los diámetros hidrodinámicos.

En la Tabla 3, se resumen los resultados de diámetro promedio y desviación estándar de todos los NH y además se muestran los índices de polidispersidad obtenidos, donde se refleja que los mismos estuvieron entre 0,2 y 0,5, indicando baja polidispersidad entre las partículas (Sathiyaseelan et al., 2020).

Tabla 3. Diámetros hidrodinámicos e índices de polidispersidad de los NHs.

Nanohíbridos	Diámetro (nm)	Desviación estandar (±)	Pdl
NH Pch1 (1,2 mg/mL)	143,0	91,6	0,4
NH Pch2 (2,4 mg/mL)	142,0	77,6	0,4
NH Pch3 (4,8 mg/mL)	115,9	70,7	0,5
NH Pa1 (1,2 mg/mL)	114,8	73,3	0,3
NH Pa2 (2,4 mg/mL)	217,1	105,5	0,3
NH Pa3 (4,8 mg/mL)	315,9	151,3	0,3
NH Th1 (1,2 mg/mL)	184,6	99,1	0,2
NH Th2 (2,4 mg/mL)	239,5	146,4	0,3
NH Th3 (4,8 mg/mL)	571,4	234,7	0,2

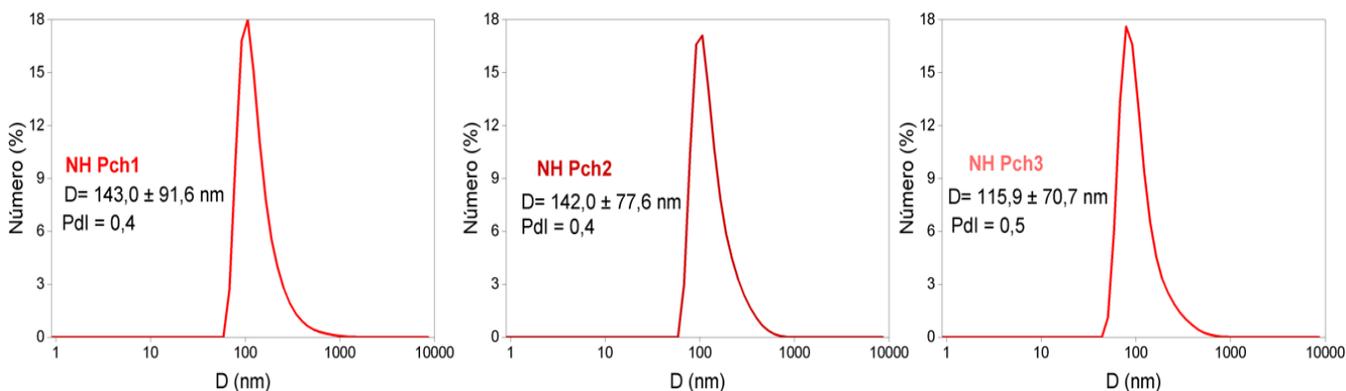


Figura 20. DLS de los nanohíbridos a partir de las nanopartículas PchNPs y a diferentes concentraciones de CS, 1,2, 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.

Sección III

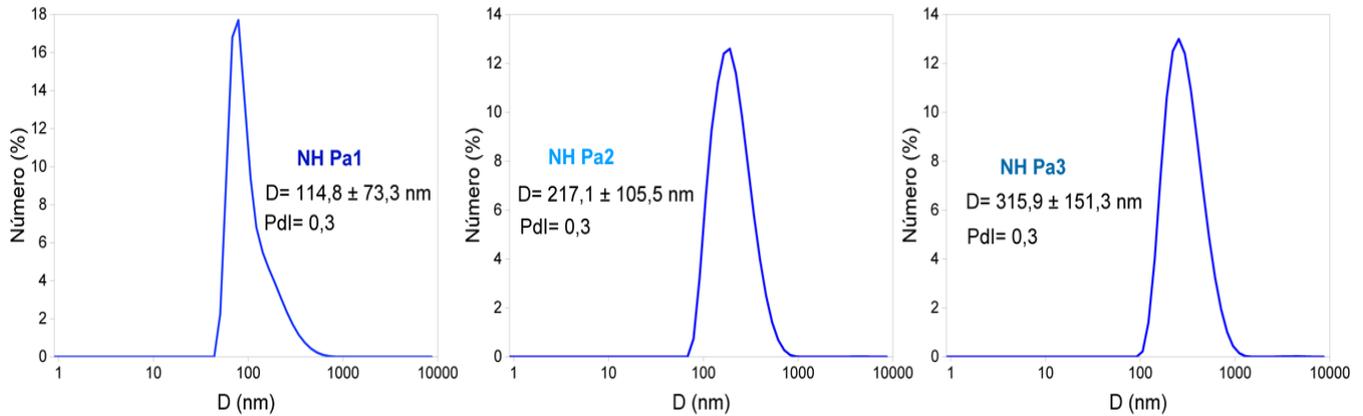


Figura 21. DLS de los nanohíbridos a partir de las nanopartículas PaNPs y a diferentes concentraciones de CS, 1,2, 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.

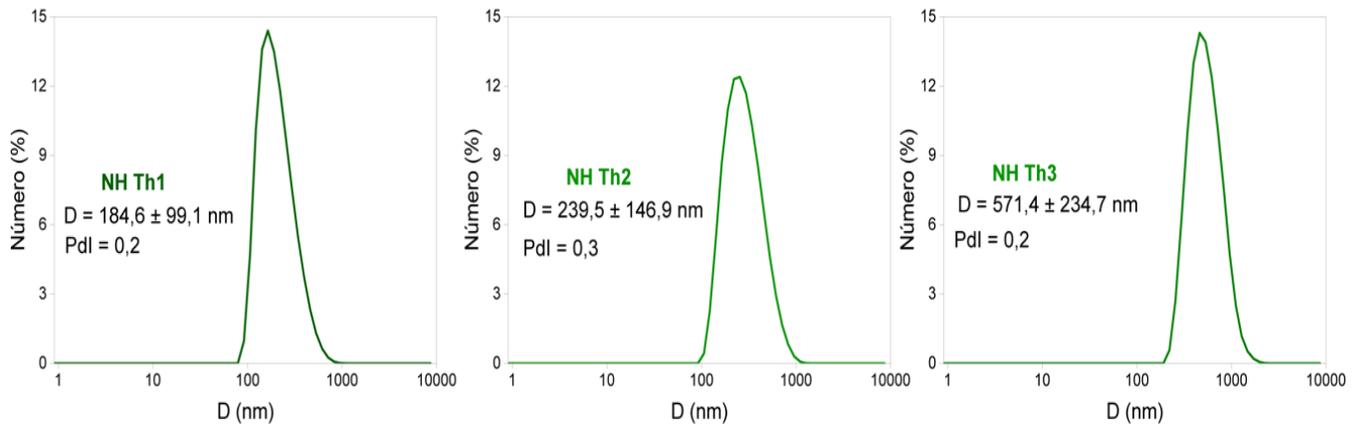


Figura 22. DLS de los nanohíbridos a partir de las nanopartículas ThNPs y a diferentes concentraciones de CS, 1,2, 2,4 y 4,8 mg/mL, respectivamente.

➤ Análisis por Potencial Z.

La evaluación del potencial Z, es una de las maneras más empleadas para predecir la estabilidad de dispersiones, emulsiones y suspensiones, ya que permite evaluar la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas que los conforman. Existe consenso en que valores de potenciales Z, en valor absoluto, mayores que 30 indican sistemas estables (Dalençon et al., 1997; Selvamani, 2019).

NPs biogénicas

El valor de potencial zeta de las AgNPs fue alrededor de -20 mV, y los resultados para cada NP se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Potencial Z de las NPs biogénicas sintetizadas.

AgNPs Biogénicas	Potencial Z (mV)	Desviación estandar (mV)
PaNPs	-18,8	± 6,9
ThNPs	-20,1	± 5,1
PchNPs	-21,1	± 9,1

CSNPs

Los potenciales zeta de las NPs de CS se muestran en la Tabla 5, los cuales fueron de +12,4 mV, +26,7 mV y +28,9 mV, para las síntesis A, B y C respectivamente.

Tabla 5. Diámetros hidrodinámicos y Potencial Z de las NPs de CS.

CSNPs	Diámetro (nm)	Desviación estandar (±)	Pdl	Potencial Z (mV)	Desviación estandar (mV)
CSNPs A	66,9	± 37,8	0,4	+12,4	± 2,8
CSNPs B	151,1	± 47,2	0,3	+26,7	± 6,3
CSNPs C	96,6	± 28,2	0,1	+28,9	± 4,8

NHs

Los resultados mostrados en las Tablas 6, 7 y 8 confirman la exitosa unión del CS y las NPs biogénicas, considerando que la carga de la solución de CS de partida fue de +53 mV, mientras que las cargas de las NPs biogénicas son alrededor de -20 mV. De los valores obtenidos se puede observar que no existen diferencias significativas entre los potenciales Z obtenidos para las distintas síntesis de un mismo tipo de NPs. Sin embargo, si se pueden observar diferencias significativas entre los distintos tipos de NHs, siendo que todos ellos muestran carga superficiales positivas, menores para el caso del NHPch y mayores para el caso del NHTh, pero indicando en todos los casos suspensiones estables (Mo et al., 2016; Mondéjar-López et al., 2022; Patil et al., 2018; Samimi et al., 2019).

Tabla 6. Potencial Z de los NHPch

Nanohíbridos CS-Ag	Potencial Z (mV)	Desviación estandar (mV)
NH Pch1	+24,4	± 5,2
NH Pch2	+29,4	± 5,3
NH Pch3	+25,9	± 6,7

Tabla 7. Potencial Z de los NHPa

Nanohíbridos CS-Ag	Potencial Z (mV)	Desviación estandar (mV)
NH Pa1	+40,2	± 6,4
NH Pa2	+36,5	± 6,2
NH Pa3	+39,9	± 7,5

Tabla 8. Potencial Z de los NHTh.

Nanohíbridos CS-Ag	Potencial Z (mV)	Desviación estandar (mV)
NH Th1	+42,0	± 4,1
NH Th2	+41,4	± 4,6
NH Th3	+40,8	± 5,8

- Resultados de la caracterización por XRD.

CSNPs Y CS

Basado en los resultados de caracterización de las CSNP previamente descritos, se seleccionaron para los siguientes estudios las CSNPs obtenidas para la condición de síntesis C.

Los patrones de difracción de rayos X (XRD) del CS y las NPs de CS se ilustran en la Figura 23. Por un lado, la Figura 23a muestra la presencia de dos picos característicos a 2θ alrededor de 10° [110] y 20° [020], además, para el caso de la CSNPs (Figura 23b), se observan cambios en las reflexiones en $2\theta = 10^\circ$ y 20° , demostrando la formación de NPs de CS. El pico cercano a los 10° desapareció abruptamente, mientras que otro alrededor de los 20° , se ensanchó y su intensidad disminuyó. Esto indica una transición hacia un estado más amorfo en las estructuras cristalinas y una disminución en la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares (Muley et al., 2018). Se ha documentado que las interacciones de entrecruzamiento iónico entre los grupos amino del CS y el TPP degradan la estructura cristalina del CS (Jampafuang et al., 2019). Es probable que las reacciones de despolimerización hayan ocurrido preferentemente en los dominios cristalinos del biopolímero, lo que se tradujo en una reducción de la intensidad de los picos característicos del CS (Jampafuang et al., 2019).

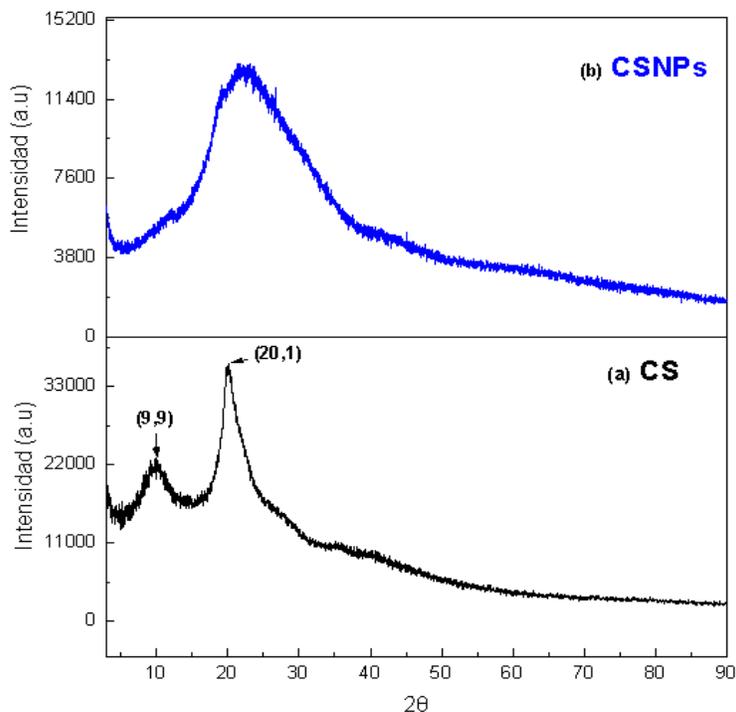


Figura 23. Patrón de difracción del CS y las NPs de CS.

Ag/AgClNPs y NHs.

Para conocer la naturaleza cristalina, estructura y fase de los NHs, se realizó un análisis de Difracción de Rayos X (Rafique et al., 2019). En las Figura 24, Figura 25 y Figura 26 se muestran los patrones de XRD de las NPs biogénicas (PchNPs, PaNPs y ThNPs) y de los NHs (NHPch, NHPa y NHTh).

En la Figura 24a, correspondiente a CS, se observa dos picos de difracción amplios en aproximadamente $2\theta = 9^\circ$ y 20° , los cuales son picos típicos de difracción del CS de carácter semicristalino (Arafat et al., 2015; Pawlicka et al., 2008). En el patrón de difracción de PchNPs (Figura 24b), se muestran reflexiones alrededor de $38,1^\circ$ y $64,3^\circ$, los cuales pueden ser compatibles con la fase cúbica de Ag, que pueden ser indexados como los planos [111] y [220] de la estructura cúbica centrada en la cara (FCC) (JCPDS card No. 65-2871). Los picos alrededor de $27,7^\circ$; $32,1^\circ$; $46,1^\circ$; $54,6^\circ$; $57,3^\circ$ y $67,2^\circ$ presentes en el patrón de difracción correspondiente a las NPs de PchNPs, podrían ser asignados a las reflexiones [111], [200],

[220], [311], [222] y [400] de AgCl con una estructura cristalina cúbica centrada en la cara (JCPDS card No. 31-1238).

De la misma manera, puede suponerse la presencia de AgCl en el NH (Figura 24c), debido a la presencia de las reflexiones antes mencionadas en el NHPch.

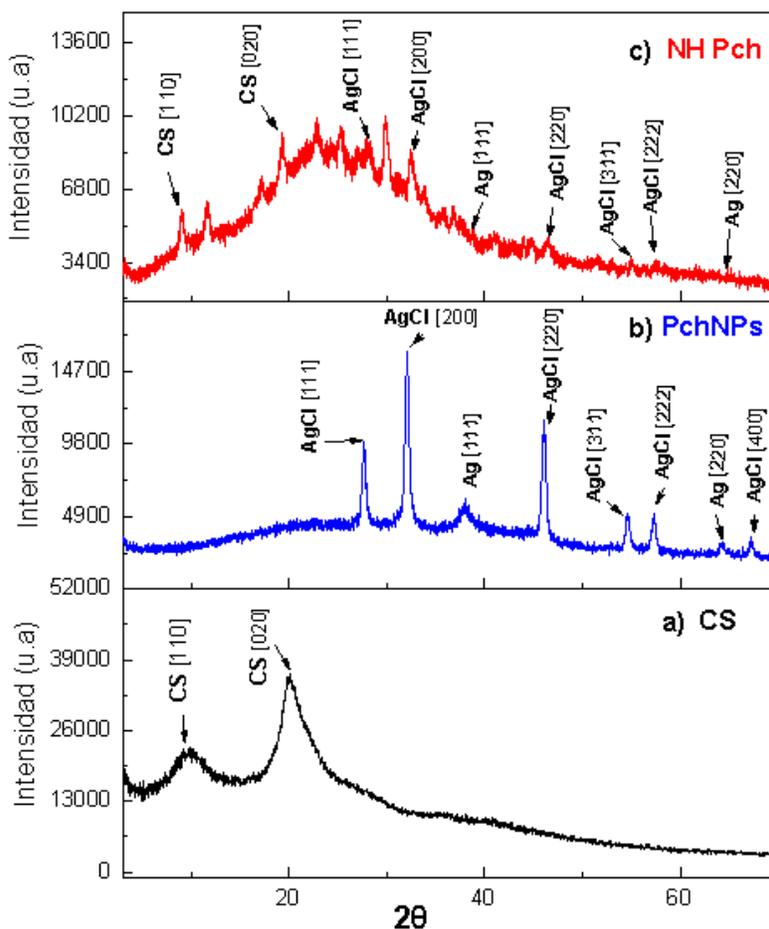


Figura 24. Patrón de Difracción de Rayos X del CS, NPs biogénicas (PchNPs) y del NHPch.

En la Figura 25b, se presenta el análisis de difracción de rayos X para las PaNPs, con picos a 38,5°, 44,5° y 64,5°, que puede corresponder a los planos cristalinos [111], [200] y [220] del Ag (JCPDS 65-2871). Además, se identifican picos alrededor de 27,7°, 32,1° y 46,3°, podrán ser asociados a los planos cristalográficos [111], [200] y [220] a la fase AgCl (JCPDS card No. 31-1238). Estas reflexiones se encuentran presentes en el patrón de difracción del NH (Figura 25c), indicando la presencia en el sistema de NHs de Ag⁰/AgCl y CS.

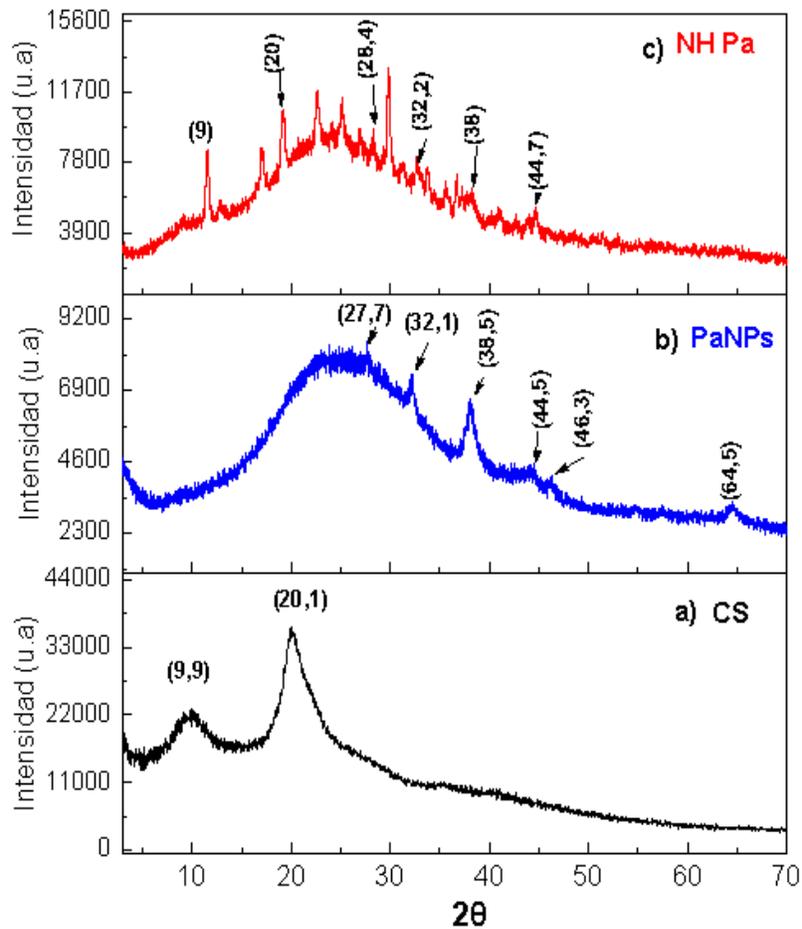


Figura 25. Patrón de XRD del CS, NPs biogénicas (PaNPs) y del NHPa.

Los patrones XRD de las ThNPs (Figura 26b) confirmaron la existencia de NPs de plata cristalina. Los picos a 38,5°, 44,5° y 64,5° que pueden ser asociados a los planos cristalográficos [111], [200] y [220] de la Ag° (JCPDS 65-2871). El patrón XRD del NHTh (Figura 26c) presenta los picos característicos de la Ag y picos adicionales a 27,7°, 32,1° y 46,3°, atribuibles a los planos cristalográficos [111], [200] y [220] del AgCl (JCPDS card No. 31-1238), demostrando la presencia de Ag/AgClNPs en el NH. Los resultados de XRD proporcionan evidencia de la coexistencia de ThNPs y CS, debido a que el patrón XRD del NH Th presenta picos de Ag°, AgCl y CS. Los picos adicionales no identificados, que se observan en los estudios de XRD de los NHs (Figura 24c, 25c y Figura 26c), pueden deberse a los constituyentes del agente estabilizante (proveniente del filtrado fúngico) que rodea a las NPs biogénicas, como se ha mostrado en otros trabajos de síntesis biológica (Palithya et al., 2021).

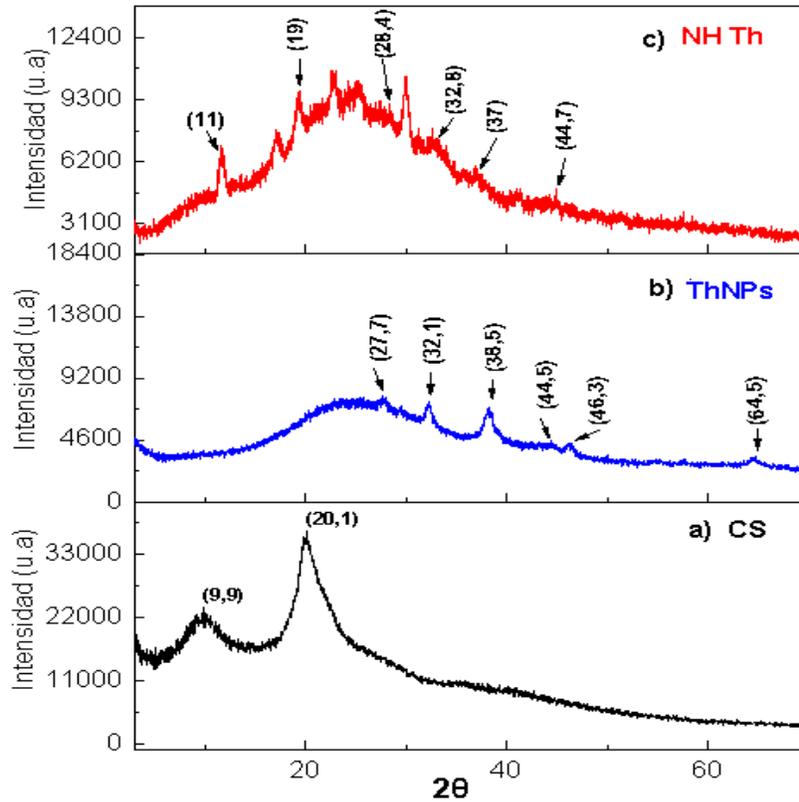


Figura 26. Patrón de XRD del CS, NPs biogénicas (ThNPs) y del NHTh.

➤ Análisis de FTIR.

CSNPs y CS

El espectro de FTIR del CS y de las NPs de CS liofilizadas, se muestran en la Figura 27. De acuerdo a lo observado y basado en bibliografía (Rodríguez Hamamura et al., 2010; Sullivan et al., 2018), el espectro del CS muestra picos principales en: 1025 cm^{-1} indicando un estiramiento simétrico C-O-C (de la unidad de glucosamina del CS), 1572 cm^{-1} que sugiere una deformación del enlaces N-H (amina), 1648 cm^{-1} indicando estiramiento de la amida I (C=O), 2866 cm^{-1} sugiere una banda de estiramiento vibracional C-H y el pico amplio de 3200 a 3500 cm^{-1} que puede ser asignado a una combinación de estiramientos simétricos y asimétricos de NH y vibracionales de OH. El espectro de las NPs de CS, difiere con el del CS en varios picos como: C-O-C en anillo glucosídico cambió de 1025 cm^{-1} a 1032 cm^{-1} , el N-H amina que cambió de 1572 cm^{-1} a 1555 cm^{-1} y la amina primaria en 13312 cm^{-1} cambió a 1350 cm^{-1} mientras que el pico solapado de N-H y O-H en $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ ha disminuido la

intensidad y se ha ensanchado, sugiriendo que ocurrió una gelificación iónica del polímero entre la amina protonada y el contra-ion presente en TPP. Sin embargo, el pico C=O a 1648 cm^{-1} y el pico C-H a 2865 cm^{-1} permanecieron sin cambios y estos resultados están en acuerdo con los resultados reportados por Antoniou et al. (2015) y de Sullivan et al. (2018). Además, Las bandas a 517,09; 943,68; 1070,08; 1248,19; 1299,89; 1462,2; 1735,11 y 2918,66 cm^{-1} no están presentes en el CS puro, lo que sugiere la formación de nuevas estructuras durante la formación de las NPs.

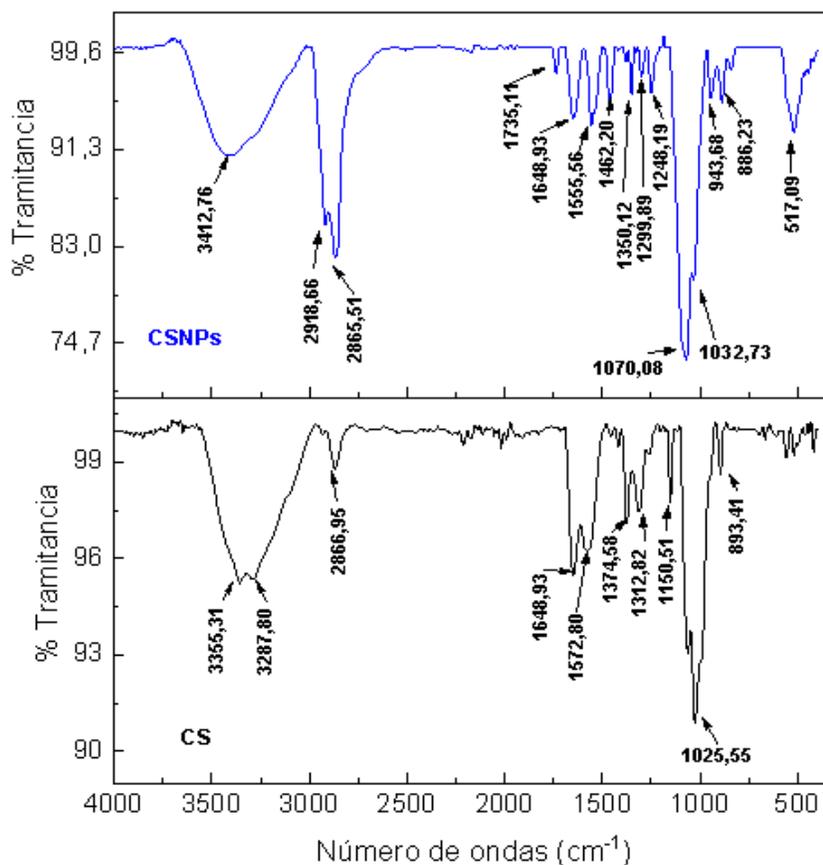


Figura 27. Espectro de FTIR del CS y de las NPs de CS.

Ag/AgClNPs y NHs

La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier es una técnica poderosa para identificar grupos funcionales de los NMs. En las Figuras 28, 29 y 30, se muestran los

resultados obtenidos para los sistemas sintetizados a partir de *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens* y *Trichoderma harzianum*, respectivamente.

En el caso de las NPs biogénicas sintetizadas a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Figura 28), el análisis FTIR revela características vibracionales significativas que nos permiten entender mejor la composición química y la estructura de estas partículas. El espectro FTIR muestra múltiples picos que corresponden a diferentes grupos funcionales presentes en las NPs biogénicas. El pico a $465,38\text{ cm}^{-1}$, está asociado al estiramiento del enlace Ag-O, lo que sugiere la formación de un enlace entre la plata y el oxígeno (Alamri et al., 2018; Guilger-Casagrande et al., 2021), contribuyendo a la estabilización de las NPs. La presencia de proteínas se sugiere mediante los picos a $564,48\text{ cm}^{-1}$ (asignado a la deformación de la amida II) y $1539,76\text{ cm}^{-1}$ (correspondiente al estiramiento de la amida I) (Ballottin et al., 2016; Parmar et al., 2019). Estos picos son indicativos de la presencia de enlaces C-N-H y C=O en proteínas. Mientras que los picos observados a $623,37\text{ cm}^{-1}$ y $1317,13\text{ cm}^{-1}$ se atribuyen a la deformación y estiramiento asimétrico de grupos amina primaria presentes en proteínas (Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; Parmar et al., 2019). También, se evidencia la presencia de polisacáridos a través del pico a $1026,99\text{ cm}^{-1}$, correspondiente al estiramiento simétrico del enlace glucosídico C-O-C en el anillo piranósico (Ahluwalia et al., 2014; Guilger-Casagrande et al., 2021; Parmar et al., 2019; Priya et al., 2020). Además, se observan picos relacionados con grupos alifáticos (CH_2) y grupos metilo (CH_3) a $2878,44\text{ cm}^{-1}$, $2915,79\text{ cm}^{-1}$ y $1376,02\text{ cm}^{-1}$ (Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; X. Li et al., 2018; Priya et al., 2020; Sanghi & Verma, 2009). Finalmente, la presencia de grupos funcionales como N-H ($3294,98\text{ cm}^{-1}$) y O-H ($3410,65\text{ cm}^{-1}$) sugiere la presencia de grupos amida e hidroxilo (Ahluwalia et al., 2014; Alamri et al., 2018; Ballottin et al., 2016; Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; X. Li et al., 2018; Parmar et al., 2019; Priya et al., 2020; Sanghi & Verma, 2009).

El análisis FTIR del NH de CS y NPs biogénicas obtenidas a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* revela una combinación distintiva de características estructurales (Figura 28). La presencia de vibraciones específicas en las regiones de los números de onda característicos confirma la existencia de ambos componentes en la muestra, la formación

exitosa del NH y la interacción entre el CS y las PchNPs. Las bandas características de Ag-O a $511,34\text{ cm}^{-1}$ y $639,17\text{ cm}^{-1}$ confirmaron la presencia de NPs biogénicas en el NH. La estructura del CS se conserva en NHPch, como lo indica la presencia de bandas C-O-C (enlace glucosídico) a $1018,37\text{ cm}^{-1}$, $1025,55\text{ cm}^{-1}$ y $1026,99\text{ cm}^{-1}$, y la banda C-H (aromático) a $801,48\text{ cm}^{-1}$, sin cambios significativos. Se observaron interacciones entre el CS y las PchNPs a través de diferentes grupos funcionales. La banda C-O-C (enlace aromático) de las PchNPs se desplazó de $1406,18\text{ cm}^{-1}$ a $1411,93\text{ cm}^{-1}$ en el espectro del NHPch. Las bandas N-H del CS ($1544,07\text{ cm}^{-1}$) y las PchNPs ($1572,8\text{ cm}^{-1}$) se desplazaron a $1539,76\text{ cm}^{-1}$ en el espectro del NHPch. La banda C=O (amida) del CS ($1637,44\text{ cm}^{-1}$) se desplazó a $1634,56\text{ cm}^{-1}$ en el espectro del NHPch, mientras que la banda de las PchNPs ($1648,93\text{ cm}^{-1}$) también se vio afectada. Finalmente, las bandas O-H del CS ($3168,58\text{ cm}^{-1}$ y $3280,62\text{ cm}^{-1}$) y las PchNPs ($3287,8\text{ cm}^{-1}$) se desplazaron a $3294,98\text{ cm}^{-1}$ y $3410,65\text{ cm}^{-1}$ en el espectro del NHPch. En general, el análisis FTIR proporciona evidencia de la formación exitosa del NHPch y sugiere una interacción entre el CS y las PchNPs a través de diversos mecanismos, incluyendo enlaces Ag-O, N-H, grupos amida y O-H.

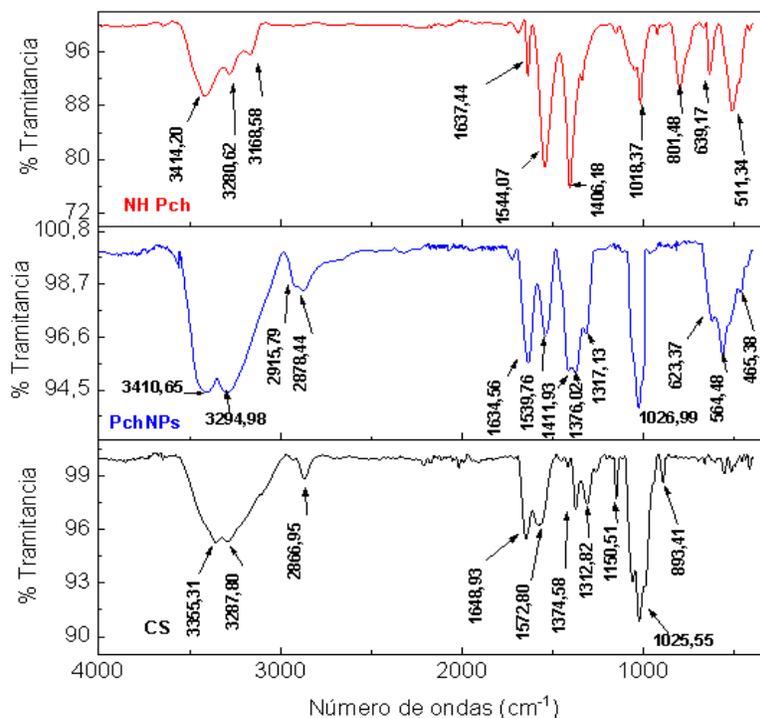


Figura 28. Espectro de FTIR del CS, NPs biogénicas (PchNPs) y del NHPch.

El análisis por espectroscopia FTIR para PaNPs se presenta en la Figura 29, donde se reveló la presencia de diversas bandas características en las NPs biogénicas obtenidas a partir del hongo *Punctularia atropurpurascens*. Entre estas, se destacan picos significativos como el estiramiento del enlace Ag-O a $461,07\text{ cm}^{-1}$, indicativo de la estabilización de las NPs (Alamri et al., 2018; Guilger-Casagrande et al., 2021). Además, se observaron vibraciones a $597,52\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a la deformación C-C-C. Los picos característicos como C-N a $1332,96\text{ cm}^{-1}$, Amida I a $1630,25\text{ cm}^{-1}$ y Amida II a $1535,46\text{ cm}^{-1}$, pueden ser atribuidos a proteínas, mientras que la vibración de estiramiento del enlace O-H a $3388,4\text{ cm}^{-1}$ sugiere la posible presencia de grupos hidroxilo (Ahluwalia et al., 2014; Alamri et al., 2018; Ballottin et al., 2016; Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; X. Li et al., 2018; Parmar et al., 2019; Priya et al., 2020; Sanghi & Verma, 2009).

Los resultados del análisis FTIR de los NHs de CS y NPs biogénicas (PaNPs) revelaron varias características significativas (Figura 29). En la región de huellas dactilares ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$), se observaron desplazamientos en las bandas de vibración que sugieren posibles interacciones entre los componentes. Por ejemplo, las bandas a $511,34\text{ cm}^{-1}$ y $639,17\text{ cm}^{-1}$ en los NHPa (no presentes en el CS ni en las PaNPs), podrían atribuirse a corrimientos en el número de onda de vibraciones de enlace Ag-O en las PaNPs (Alamri et al., 2018; Guilger-Casagrande et al., 2021). Además, la banda a $801,48\text{ cm}^{-1}$, asociada a la vibración de flexión fuera del plano de C-H en anillos aromáticos, exhibió un ligero desplazamiento hacia valores más bajos en el NH, lo que sugiere una posible interacción entre el CS y las PaNPs. En la misma línea, otras bandas, como la de $1018,37\text{ cm}^{-1}$ asignada al estiramiento simétrico del anillo piranósico C-O-C (Ahluwalia et al., 2014; Guilger-Casagrande et al., 2021; Parmar et al., 2019; Priya et al., 2020), muestra un ligero desplazamiento hacia valores más bajo en el NH, lo que también podría indicar una interacción entre los componentes ($1025,55\text{ cm}^{-1}$ y $1032,73\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a CS y PaNPs, respectivamente). Además, se observaron desplazamientos similares en bandas como la de $1407,62\text{ cm}^{-1}$ ($1374,58\text{ cm}^{-1}$ y $1377,46\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a CS y PaNPs), asignada a la deformación simétrica de los grupos metilo, y la de $1546,96\text{ cm}^{-1}$, asociada a la vibración de los enlaces N-H ($1572,8\text{ cm}^{-1}$ y $1535,46\text{ cm}^{-1}$ para CS y PaNPs).

Por otro lado, en la región de grupos funcionales ($1800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$), se destacó la conservación de ciertos grupos funcionales del CS y de las PaNPs en el NH. Por ejemplo, la banda a $3290,63\text{ cm}^{-1}$, asignada al estiramiento del enlace N-H en amida, se observó en las PaNPs y en el CS, conservando este grupo funcional en el NH. Asimismo, la banda a $3415,63\text{ cm}^{-1}$, asociada al estiramiento del enlace O-H, también mostró un ligero desplazamiento en el NH.

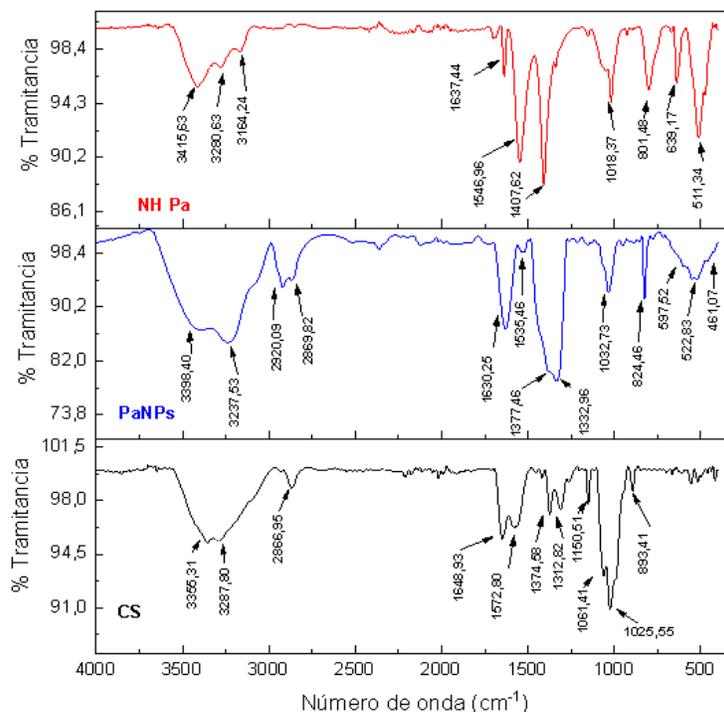


Figura 29. Espectro de FTIR del CS, NPs biogénicas (PaNPs) y del NHPa.

Los resultados del análisis FTIR de las NPs biogénicas sintetizadas a partir del hongo *Trichoderma harzianum* proporcionan una visión detallada de los grupos funcionales presentes en estas nanoestructuras (Figura 30). La presencia de un pico en $518,82\text{ cm}^{-1}$ corresponde al enlace Ag-O, indicando la estabilización de las NPs mediante el enlace entre la plata y el oxígeno (Alamri et al., 2018; Guilger-Casagrande et al., 2021). Similar a lo obtenido para PaNPs, se observaron vibraciones a $595,56\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a la deformación C-C-C. y en $1308,1\text{ cm}^{-1}$ relacionadas con grupos amina primaria (Ahluwalia et al., 2014; Guilger-Casagrande et al., 2021; Parmar et al., 2019; Priya et al., 2020). La presencia

de picos correspondientes a la amida I y amida II, indicativos de enlaces C=O y N-H en proteínas, respectivamente, detectados a $1659,72\text{ cm}^{-1}$ y $1516,9\text{ cm}^{-1}$ fueron previamente reportados (Ballottin et al., 2016; Parmar et al., 2019). Además, la presencia de picos en $804,46\text{ cm}^{-1}$ y $1387,51\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a vibraciones de flexión fuera del plano de C-H en anillos aromáticos y a la deformación simétrica de grupos metilo (Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; X. Li et al., 2018; Priya et al., 2020; Sanghi & Verma, 2009), sugiere la presencia de compuestos aromáticos y proteicos. Los picos en $2866,61\text{ cm}^{-1}$ y $2924,24\text{ cm}^{-1}$ pueden ser asociados con vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico de grupos metileno (Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; X. Li et al., 2018; Priya et al., 2020; Sanghi & Verma, 2009). Finalmente, similar a lo observado con las PaNPs, se detectaron vibraciones características de enlaces N-H en amidas a $3246,63\text{ cm}^{-1}$ y de estiramiento del enlace O-H a $3351,87\text{ cm}^{-1}$ (Ahluwalia et al., 2014; Alamri et al., 2018; Ballottin et al., 2016; Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; X. Li et al., 2018; Parmar et al., 2019; Priya et al., 2020; Sanghi & Verma, 2009). Estos resultados indican que las ThNPs están estabilizadas por una matriz compleja de proteínas y otros compuestos orgánicos, lo que contribuye a su formación y estabilidad (Ahluwalia et al., 2014; Alamri et al., 2018; Ballottin et al., 2016; Guilger-Casagrande et al., 2021; Jyoti et al., 2016; X. Li et al., 2018; Parmar et al., 2019; Priya et al., 2020; Sanghi & Verma, 2009).

Con respecto, al análisis del espectro FTIR del NHTh (Figura 30), revela una serie de bandas características que ofrecen información valiosa sobre su estructura y composición. Se detectaron bandas correspondientes al enlace Ag-O en las ThNPs en $514,21\text{ cm}^{-1}$ y $640,41\text{ cm}^{-1}$, confirmando la presencia de las NPs de plata en el NH. Estas bandas presentaron desplazamientos en comparación a las ThNPs, lo que sugiere interacciones entre el CS y las NPs biogénicas en el NH. Además, se observaron vibraciones asociadas con los enlaces glucosídicos del CS en $801,48\text{ cm}^{-1}$, lo que indica la contribución del CS a la estructura del NH. Estas bandas también mostraron cambios en su posición, lo que sugiere posibles interacciones entre el CS y las ThNPs. Se detectaron vibraciones de C-H aromático en $1018,37\text{ cm}^{-1}$, indicando la presencia de compuestos aromáticos, posiblemente derivados de las NPs biogénicas o de otros componentes orgánicos, y también presentaron desplazamientos,

sugiriendo interacciones en esta región. La banda de CH₃ (deformación) en 1409,06 cm⁻¹ y la vibración de N-H (amina) en 1549,82 cm⁻¹ sugieren la presencia de grupos metilo y aminos, posiblemente provenientes tanto del CS como de las proteínas presentes en las ThNPs. Estas bandas también muestran desplazamientos, lo que indica interacciones de estos grupos. La banda de estiramiento de la amida I (C=O) en 1637,44 cm⁻¹ confirma la presencia de estructuras de amida, probablemente derivadas del CS o de las ThNPs en el NH. Las vibraciones de estiramiento del enlace O-H en 3168,58 cm⁻¹ y 3418,51 cm⁻¹ sugieren la presencia de grupos hidroxilos en el nanohíbrido, posiblemente derivados del CS u otros componentes orgánicos, y también presentan desplazamientos, indicando interacciones en estas regiones. En conjunto, estos resultados apuntan a interacciones significativas entre el CS y las ThNPs, además que proporciona evidencia de la formación exitosa del NH.

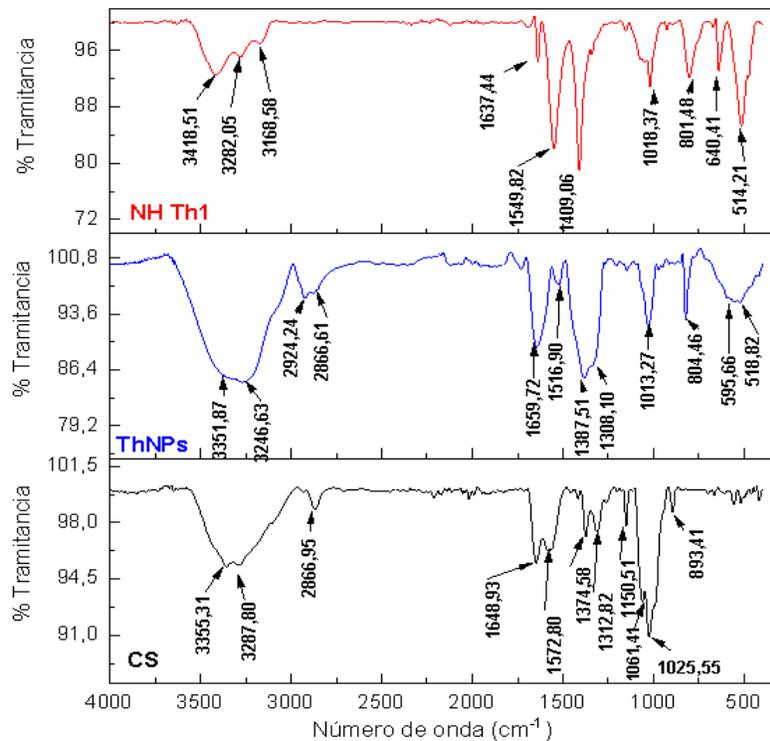


Figura 30. Espectro de FTIR del CS, NPs biogénicas (ThNPs) y del NHTh.

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía de dispersión de energía (EDS).

Las técnicas de microscopía electrónica son ampliamente utilizadas para examinar la morfología, dimensiones, propiedades superficiales y estructura de los NMs. En este estudio, se empleó TEM para investigar el tamaño, distribución, forma y fases cristalinas presentes en el nanohibrido NHPch1. Las imágenes de TEM (Figura 31a, b y c) revelan la presencia de NPs esféricas, con una distribución de tamaño que oscila entre 23 y 100 nm como se muestra en el histograma de la Figura 31d y un tamaño promedio de 65 ± 35 nm (más pequeñas que las reportadas por DLS que mide el radio hidrodinámico).

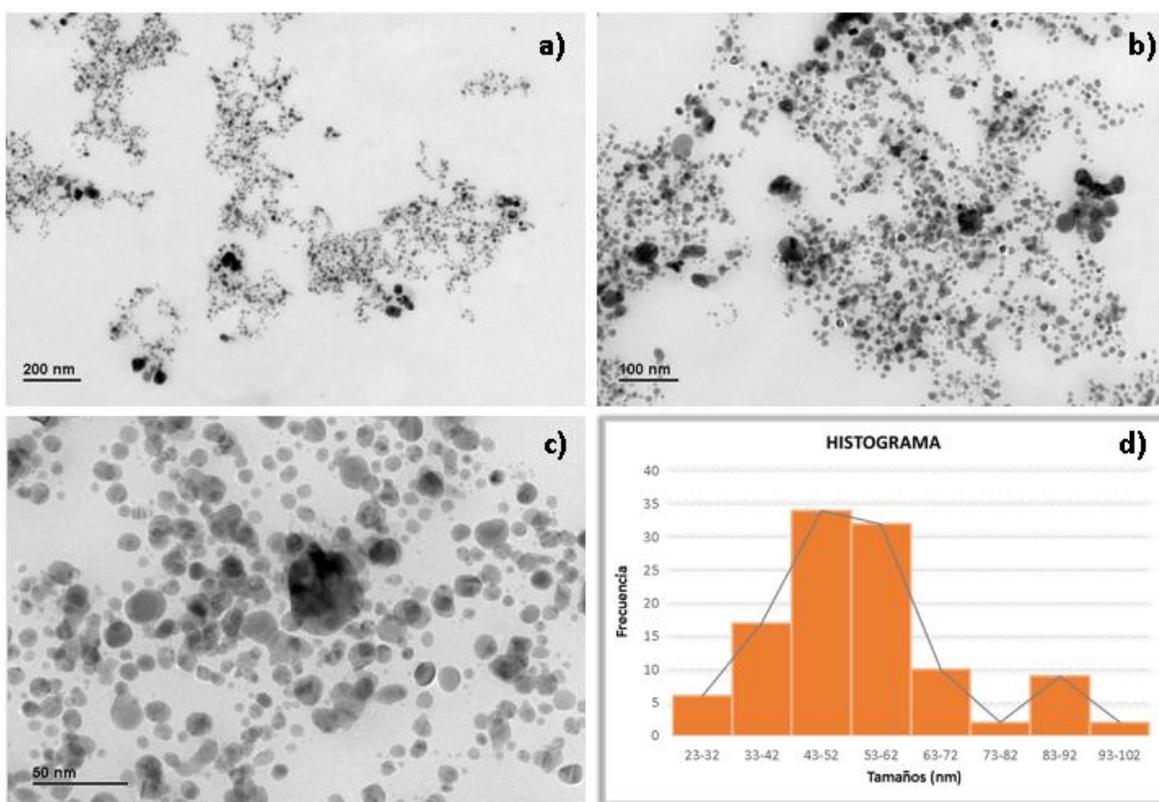


Figura 31. Micrografías de los NHPch1 a diferentes escalas: a) 200 nm, b) 100 nm y c) 50 nm; d) histograma de las mediciones de tamaños de partículas.

Los resultados obtenidos al medir las distancias interplanares y aplicar la transformada de Fourier a las imágenes adquiridas por TEM (Figura 32a, b y c) proporcionan información

valiosa sobre la estructura cristalina de los materiales investigados (Figura 32d). Por ejemplo, se observó presencia del compuesto de plata (Ag°), debido a que se determinaron distancia interplanares de 2,0 Å correspondiente al plano cristalino [200], y otra de 2,4 Å asociada al plano [111], lo que coincide con los valores de referencia del código 004-0783. Se registraron distancias interplanares de 2,6 Å y de 4,6 Å lo que podría llegar a ser asignado a alguna fase cristalina de Ag asociada con algún grupo orgánico, como por el ejemplo el oxalato de plata. Y, por último, se indica la presencia del compuesto AgCl , ya que se identificaron distancias interplanares de 3,2 Å, plano [111] y 2,7 Å (plano [200]), lo cual concuerda con las características estructurales reportadas bajo el código 006-0480. Estos resultados revelan la cristalinidad de los compuestos estudiados y confirman la viabilidad de la metodología empleada para analizar la estructura cristalina de los materiales mediante la transformada de Fourier de las imágenes obtenidas por TEM. La concordancia entre las distancias interplanares medidas y los valores de referencia proporciona una sólida validación de los hallazgos experimentales.

A la muestra también se le realizó el análisis mediante Espectroscopia de Energía Dispersiva para identificar la composición elemental en el NH. La presencia de diferentes elementos en los NHPch se determinó a través de este análisis, lo que proporciona información crucial sobre la estructura y composición de los materiales sintetizados. El espectro (Figura 33) exhibió un pico de plata alrededor de 3 KeV, indicando la presencia de AgNPs (Vijayabharathi et al., 2018). Investigaciones previas respaldan estos hallazgos, como los reportes de Pandiarajan et al. (2018) y Tharani et al. (2020). Se sugirió que la detección de nitrógeno (N) en el espectro EDS se debía a los grupos amino (-NH) del CS, lo que respalda la presencia de CS en los NHs (Dananjaya et al., 2017). Este fenómeno se ha observado anteriormente, como lo documentaron Senthilkumar et al. (2019) en NPs híbridas CS-Ag de síntesis biológica. También se detectó un pico alrededor de 2,6 KeV correspondiente al cloro, esto es indicativo de presencia de AgCl en el NH (Tharani et al., 2020). La detección de otros picos podría atribuirse a la excitación de rayos X de la fase orgánica del CS, de las NPs biogénicas y de la rejilla utilizada (Bharathi et al., 2018). Los porcentajes de elementos presentes en los NHPch

se detallan en la Tabla 9. Por último, la presencia del cobre en los resultados, es debido a la rejilla que se emplea para realizar el análisis.

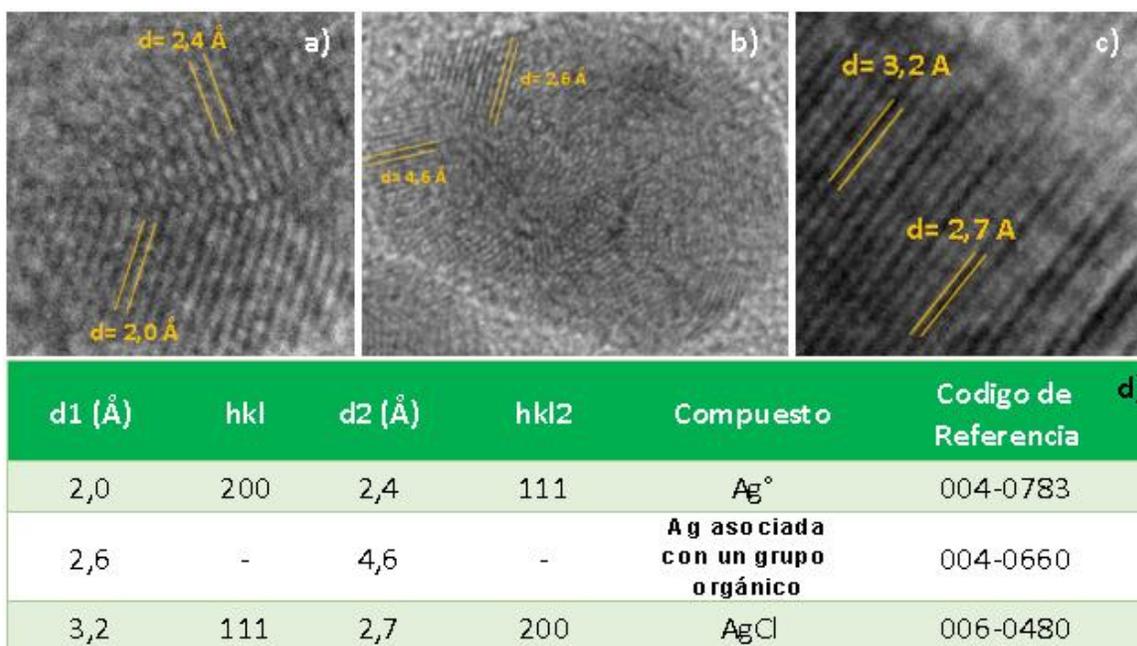


Figura 32. Mediciones de distancias interplanares y determinación de fases cristalinas presentes en los NHPch.

Tabla 9. Porcentajes de elementos presentes en la síntesis de los NHPch.

Element	Wt%	Wt% Sigma
C	37.99	0.27
N	1.66	0.21
O	7.55	0.14
Na	8.22	0.11
Si	0.22	0.03
S	0.36	0.03
Cl	2.09	0.06
Cr	0.10	0.02
Cu	24.48	0.18
Ag	16.69	0.22
Au	0.64	0.08
Total:	100.00	

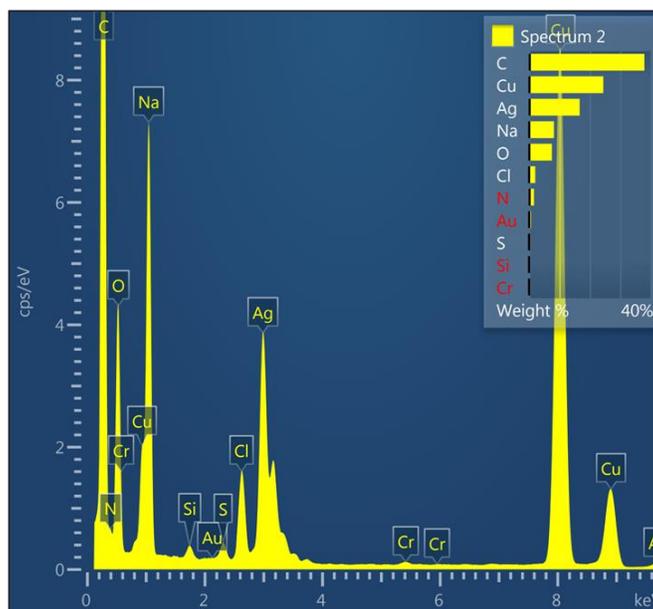


Figura 33. Análisis espectral EDS de los NHPch.

5.1.2 Discusión

Como se mencionó en la Introducción la combinación de AgNPs biogénicas con CS parece prometedora para desarrollar nuevos materiales híbridos con diversas aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, para el control de fitopatógenos. En este estudio, se llevó a cabo la síntesis y caracterización de NPs biogénicas obtenidas a partir del micelio de los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens* y *Trichoderma harzianum*, así como de NPs de CS y NHs de CS-NPs biogénicas.

En primer lugar, la síntesis de las NPs biogénicas se llevó a cabo de acuerdo a estudios previos del grupo de investigación, obteniéndose resultados reproducibles. La coloración marrón-amarillenta de los productos obtenidos indica la formación de Ag/AgClNPs, corroborada por los espectros de absorción UV-Vis, donde se observa una banda de RPS de las AgNPs a 400-450 nm (Sanguñedo et al., 2018, 2019, 2023). Además, se observó la presencia de una banda de absorción a 260 nm atribuible a excitaciones electrónicas en residuos de triptófano y tirosina de las proteínas posiblemente presentes en las NPs biogénicas. Esta observación

indicaría la liberación de proteínas en el filtrado fúngico y sugiere un posible mecanismo para la reducción de los iones metálicos presentes en la solución coloidal. Uno de los primeros posibles mecanismos reportados en la síntesis de NPs de plata por hongos sugiere que la reducción de Ag^+ a Ag^0 se debe principalmente a una conjugación entre antraquinona y el transportador de electrones con la participación de la reductasa dependiente de NADH (Durán et al., 2005). Por otro lado, Hietzschold et al. (2019) demostraron que la síntesis de NPs ocurre por la acción de NADPH, sin necesidad de la enzima reductora de nitrato. Esto es particularmente interesante, ya que abre la posibilidad de utilizar diferentes organismos para la síntesis de NPs, sin la condición necesaria de producción de la enzima reductasa. Otro estudio (Cisternas et al., 2021), propusieron que compuestos de bajo peso molecular como la hidroquinona podrían servir como agente reductor en la síntesis de NPs, mientras que las proteínas que contienen residuos de L-cisteína pueden tener roles duales tanto como agentes reductores como estabilizadores. En líneas generales, la síntesis biogénica de AgNPs por hongos consta de dos pasos: la reducción de los iones de plata en el núcleo de las NPs y el recubrimiento de las NPs con el agente estabilizante (Rai et al., 2021).

Por otro lado, los análisis de XRD confirmaron el carácter cristalino de las Ag/AgCl NPs en las diferentes síntesis de NPs biogénicas. Se identificaron las fases cristalinas de Ag y AgCl, ambas son cúbicas con una red *fcc* y un agrupamiento espacial *Fm3m*. La reducción biológica semicontrolada en solución acuosa de iones metálicos como la plata (Ag^+) produce Ag^0 , pero también NPs de AgCl, que son los compuestos más comunes encontrados en el producto final de NPs basadas en Ag biosintetizadas a partir de hongos (Durán et al., 2014; Spagnoletti et al., 2019; U Picoli et al., 2016; Vilamová et al., 2019).

El análisis por Dispersión de Luz Dinámica revela que las AgNPs tienen un diámetro hidrodinámico promedio entre 20 y 25 nm, con un índice de polidispersidad alrededor de 0.3, lo que indica una distribución relativamente homogénea de tamaño y una agregación significativamente baja. Este resultado es crucial, ya que las propiedades biológicas y físicas de las NPs están fuertemente influenciadas por su tamaño y dispersión. El potencial Zeta de alrededor de -20 mV de las Ag/AgClNPs confirma su excelente estabilidad en suspensión, atribuible a la repulsión electrostática entre las partículas. Este valor negativo se puede

deber a los grupos carboxilos y/o hidroxilos que son una fuente plausible del potencial zeta negativo y que están presentes en las proteínas producidas por los hongos. Estos resultados van acordes a lo obtenido mediante el análisis de FTIR de las Ag/AgClNPs biogénicas, debido que el análisis FTIR sugiere una interacción entre la plata y las proteínas presentes en el hongo. Se identificaron bandas características que sugieren la presencia de proteínas como: Glicina (alrededor de 564 cm^{-1} , 623 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} , 1634 cm^{-1}), L-valina (465 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} y 1634 cm^{-1}), L-Proline (1026 cm^{-1} , 1412 cm^{-1}) L-serina (1317 cm^{-1} y 1634 cm^{-1}), L-glutamato (465 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} y 1539 cm^{-1}), las cuales tienen grupos funcionales amida II, amina, C-O-C, C=O, OH, que contribuyen a la estructura y estabilidad de las NPs (De Gelder et al., 2007; Guilger-Casagrande et al., 2021; Tasic et al., 2023).

Al comparar los resultados de la síntesis biogénica de NPs a partir de los tres hongos (*P. chrysosporium*, *P. atropurpurascens* y *T. harzianum*), obtenidos en esta tesis, con los reportados en investigaciones anteriores por nuestro grupo de investigación, los resultados fueron, en términos generales, coincidentes, demostrando la reproducibilidad de la síntesis biológica (Sanguñedo et al., 2018, 2019, 2023).

Otro de los sistemas preparados y caracterizados fueron las NPs de CS, donde la caracterización proporcionó una visión detallada de los procesos involucrados y las propiedades resultantes de estas nanoestructuras. En primer lugar, la síntesis de las NPs se realizó mediante la técnica de gelación iónica utilizando tripolifosfato como agente entrecruzante. Se exploraron tres condiciones de preparación, variando el tiempo de homogenización y la concentración de la solución de ácido acético, lo que permitió obtener diferentes tamaños y distribuciones de las partículas. Los resultados de la caracterización de las NPs muestran que presentan tamaños promedio de 69,9 nm, 151,1 nm y 96,6 nm, distribuciones de tamaños estrechos. Además, se observó que los ajustes en las condiciones de síntesis condujeron a una reducción en la polidispersidad de las partículas, lo que sugiere una mayor homogeneidad en la muestra final. Estos resultados van en línea con los reportados por Winayu et al. (2019), donde reportan que la reducción de la concentración de ácido acético afecta el tamaño de las NPs de CS. El ácido acético se utiliza para protonar los grupos amino del CS. La cantidad suficiente de ácido acético provoca que ocurra la

protonación, de modo que haya muchas cargas positivas disponibles para entrecruzarse con la carga negativa del TPP y formar un tamaño de partícula más pequeño. Por lo que es importante evaluar la mejor concentración de ácido acético para la síntesis de CSNPs, debido a que altos valores de concentración provoca la aglomeración (Winayu et al., 2019).

El análisis del potencial zeta reveló valores positivos para todas las muestras, indicando una carga superficial positiva en las NPs. Esta carga positiva es crucial para la estabilidad de las nanoformulaciones, ya que facilita las interacciones electrostáticas con el agente entrecruzante (Antoniou et al., 2015; Sullivan et al., 2018). Los patrones de difracción de rayos X, mostraron cambios en la estructura cristalina del CS después de la formación de las NPs. Se observó una transición hacia un estado más amorfo, lo que sugiere la degradación de los enlaces de hidrógeno intramoleculares debido a las interacciones de entrecruzamiento iónico con el TPP (Jampafuang et al., 2019). Por último, el análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) reveló cambios en los picos característicos del CS después de la formación de las NPs, indicando la formación de nuevos enlaces. Esto sugiere que se dio el entrecruzamiento entre los grupos amino protonados del quitosano y los contraiones del TPP, lo que contribuye a la estabilización de las NPs (Antoniou et al., 2015; Sullivan et al., 2018).

En un esfuerzo por combinar las ventajas de ambos materiales, se han explorado los NHs. Estos NMs pueden combinar las propiedades beneficiosas del CS y la actividad antimicrobiana de las AgNPs, creando así sistemas con potencial para aplicaciones agrícolas diversas y sostenibles (P. Chen et al., 2007; Sanpui et al., 2008). El proceso de síntesis y caracterización de estos NHs implica una comprensión de las interacciones entre los componentes individuales. Desde la síntesis de Ag/AgClNPs biogénicas utilizando filtrados de hongos hasta la formación y caracterización de NHs con CS, cada paso del proceso juega un papel crucial en la determinación de las propiedades finales de los NMs resultantes. En este sentido, se sintetizaron NHs y se caracterizaron por técnicas complementarias. Los espectros UV-Vis de los NHs, muestran un pico de longitud de onda máximo a 420 nm, indicativo de la presencia de AgNPs. Este fenómeno es consistente con la literatura previa (P. Chen et al., 2007; Sanpui et al., 2008). Además, los picos de absorción en el rango de 410 a 420 nm son

típicos de NHs de CS-Ag, lo que da indicios de la formación exitosa de los NHs (Senthilkumar et al., 2019; Shahid-ul-Islam et al., 2019).

Los resultados de DLS muestran un aumento en los diámetros hidrodinámicos de los NHs a medida que se incrementa la concentración de CS, desde 100 a 300 nm. Estos resultados son coherentes con los hallazgos previos (Shinde et al., 2021). Además, los valores de polidispersidad están entre 0,2 y 0,4, lo que indica baja agregación y aglomeración de partículas, confirmando la estabilidad coloidal de los NHs (Sathiyaseelan et al., 2020). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por TEM, que revelan la presencia de NPs esféricas con un tamaño promedio de 65 nm.

Los resultados del potencial Zeta, muestran un aumento en la carga superficial positiva con el aumento de la concentración de CS. Esto indica suspensiones estables y monodispersas, lo que coincide con estudios anteriores (Patil et al., 2018; Samimi et al., 2019). La presencia de una carga positiva atribuida al CS confirma la estabilización de las NPs.

Los estudios por difracción de rayos X de todos los NHs, indican la presencia de las fases cristalinas de AgCl en coexistencia con la Ag⁰ y el CS. La introducción de NPs biogénicas cargadas negativamente induce un mayor grado de desorden en la estructura del CS, como lo indican los aumentos del fondo amorfo y la disminución en la cristalinidad. Estos resultados están en línea con investigaciones previas que sugieren interacciones de entrecruzamiento iónico entre el CS y las AgNPs (Alharthi et al., 2022; Jampafuang et al., 2019; Parmar et al., 2019). Además, los resultados obtenidos a través de EDS muestran la presencia de los principales componentes (C, Ag, Na, O, Cl) hallados también en las AgNPs biogénicas en estudios previos realizados por el grupo (Sanguiniedo et al., 2023).

La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier proporciona una visión detallada de los grupos funcionales presentes en los NMs derivados de hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens* y *Trichoderma harzianum*. Para todas las NPs se observaron una diversidad de picos que corresponden a diferentes grupos funcionales presentes en estas nanoestructuras. Los picos observados sugieren la presencia de enlaces Ag-O o Ag-N, que podrían indicar la unión del *core* de la nanopartícula al *capping*

de naturaleza biológica, así como la presencia de bandas asignables a amino ácidos presentes en las proteínas del *capping*, como previamente descrito para NPs biogénicas (Estevez et al., 2020; Guilger-Casagrande et al., 2021; Sanguiniedo et al., 2023).

El análisis de los NHs de CS y NPs biogénicas muestra desplazamientos en los picos característicos, lo que sugiere interacciones entre el CS y las NPs. Estas interacciones se evidencian a través de cambios en las vibraciones asociadas con los grupos funcionales de ambos componentes, como los enlaces Ag-O, N-H, y O-H, lo que confirma la formación exitosa de los NHs y la interacción entre el CS y las NPs biogénicas (Mondéjar-López et al., 2023; Priya et al., 2020; Senthilkumar et al., 2019; Tharani et al., 2020).

Trabajos previos (Hermosilla et al., 2023) han reportado la síntesis biológica de NMs a base de CS y plata a partir del micelio del hongo de podredumbre blanca *Stereum hirsutum*, formando perlas fúngicas de CS para luego sintetizar las CS-AgNPs. Las NPs resultantes se caracterizaron utilizando diversas técnicas, incluida espectrofotometría UV-visible, microscopía electrónica de transmisión, dispersión dinámica de la luz y análisis de difracción de rayos X. El análisis reveló que las NPs sintetizadas estaban compuestas por NPs de CS-plata (CS-AgNPs), con absorbancia a 420 nm y potencial zeta de -27 a -20 mV, con un tamaño de 25 nm. En otro estudio (Raza et al., 2021), sintetizaron AgNPs utilizando biomasa fúngica (*Aspergillus fumigatus* KIBGE-IB33). Las NPs sintetizadas biológicamente fueron recubiertas con CS para mejorar y aumentar las propiedades del sistema nanocompuesto desarrollado. Observaron la formación de AgNPs con su máxima absorbancia a 420 nm, un tamaño promedio y un valor de potencial zeta de 5 nm (77,0%) y -22,1 mV, respectivamente, con un índice de polidispersión de 0,4. Del mismo modo, los nanocompuestos de plata-CS fabricados revelaron un tamaño de 941 nm con un potencial zeta e índice de polidispersión de +63,2 mV y 0,57, respectivamente. El exitoso recubrimiento de CS en las AgNPs evitó la aglomeración del nanomaterial y también facilitó la estabilización del nanosistema.

Los estudios previos han demostrado la efectividad de estos NHs en aplicaciones antimicrobianas tanto en contextos agrícolas como médicos (Hermosilla et al., 2023; Raza et al., 2021; Sanghi & Verma, 2009). Además, la investigación continúa explorando nuevas

formas de mejorar la síntesis y caracterización de estos NHs, así como sus aplicaciones potenciales en diversos campos.

En resumen, la síntesis y caracterización de NHs en esta tesis representan un área de investigación emocionante y prometedora en el campo de la nanotecnología. En particular, estos NMs tienen el potencial de abordar algunos de los desafíos más urgentes en la agricultura moderna, ofreciendo soluciones sostenibles y eficaces para el control de enfermedades de las plantas y la mejora de la producción agrícola.

5.2 Actividad antifúngica in vitro de los NMs frente a patógenos de relevancia agrícola.

5.2.1 Resultados

Como se mencionó en Introducción, la búsqueda de nuevos métodos de química verde y alternativas para controlar patógenos fúngicos en enfermedades de cultivos, así como en la postcosecha y almacenamiento, ha llevado a evaluar diversos NMs que incluyen AgNPs y CS frente a una variedad de hongos fitopatógenos (Mondéjar-López et al., 2023). En esta tesis se examinó la actividad antifúngica de las NPs de CS, las NPs biogénicas, la solución de CS y los NHs, frente a hongos de relevancia agrícola.

Determinación de CIM de AgNP biogénicas

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la concentración mínima de NPs o NHs que no produce un crecimiento visible del hongo, frente a *F. graminearum*, *A. niger*, *P. expansum* y *P. oryzae*. En concentraciones inferiores a la CIM, al igual que en los controles de crecimiento, se observó la germinación de esporas y el desarrollo del micelio.

En la Tabla 10, se muestra la CIM de las NPs biogénicas (PchNPs, PaNPs y ThNPs) frente a *F. graminearum*, *A. niger*, *P. oryzae* y *P. expansum*. Las PchNPs mostraron valores de CIM entre 0,007 y 0,026 $\mu\text{g/mL}$, con una máxima actividad frente a *P. oryzae* y una mínima actividad ante *F. graminearum*. En el caso de las PaNPs indicaron valores entre 0,046 y 0,180 $\mu\text{g/mL}$; mientras que las ThNPs exhibieron cifras entre 0,022 y 0,044 $\mu\text{g/mL}$. Las PchNPs mostraron

en general resultados de CIM más bajos, en comparación con las otras dos NPs biogénicas (PaNPs y ThNPs), mostrando más efectividad contra los patógenos evaluados.

Tabla 10. CIM de las NPs biogénicas de plata (PchNPs, PaNPs y ThNPs).

Microorganismos	CIM PchNPs ($\mu\text{g/mL}$)	CIM PaNPs ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ThNPs ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Aspergillus niger</i>	0,010	0,180	0,044
<i>Fusarium graminearum</i>	0,026	0,046	0,023
<i>Pyricularia oryzae</i>	0,007	0,091	0,023
<i>Penicillium expansum</i>	0,015	0,046	0,022

Determinación de CIM de CS y CSNPs

Además de las AgNPs, se evaluó la actividad antifúngica de la solución de CS y de las diferentes CSNPs sintetizadas (A, B y C) frente a los mismos cuatro fitopatógenos (Tabla 11). La CIM de la solución de CS presentó un efecto antifúngico tan bajo como $10 \mu\text{g/mL}$ para *F. graminearum*, seguidamente de $90 \mu\text{g/mL}$ frente a *P. oryzae*, $190 \mu\text{g/mL}$ contra *P. expansum*, mientras que fue de $750 \mu\text{g/mL}$ para *A. niger*.

Por otro lado, las CSNPs no mostraron actividad antifúngica ni siquiera en las máximas concentraciones evaluadas (80 , 90 y $50 \mu\text{g/mL}$ para CSNPs A, B y C, respectivamente). A mayores concentraciones de CSNPs se pierde la estabilidad coloidal y por lo tanto las CSNPs agregan.

Por lo tanto, comparando los resultados obtenidos se observa que la solución de CS tiene mayor actividad antifúngica (CIM menor) que las CSNPs frente a *F. graminearum*.

Tabla 11. CIM de la solución de CS y de las CSNPs.

Microorganismos	sln de CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CIM CSNPsA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CIM CSNPs B ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CIM CSNPs C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Aspergillus niger</i>	750	No determinado	> 90	> 50
<i>Fusarium graminearum</i>	10	> 80	> 90	> 50
<i>Pyricularia oryzae</i>	90	> 80	> 90	> 50
<i>Penicillium expansum</i>	190	No determinado	> 90	> 50

*No determinado, no se logró determinar la CIM de las CSNPsA.

Determinación de CIM de los NHs CS-AgNPs

En el caso de los NHs se decidió realizar, en paralelo a las caracterizaciones obtenidas en las distintas condiciones de síntesis, la caracterización de actividad antifúngica de todos los productos de síntesis frente a dos hongos: *A. niger* y *F. graminearum*. La habilidad de los NHs de inhibir el crecimiento de las cepas *A. niger* y *F. graminearum* se muestran en la Tabla 12. Los resultados obtenidos, expresados en Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) frente a *A. niger* y *F. graminearum*, revelan datos interesantes sobre la eficacia de estos NHs como agentes antifúngicos.

Se observa que los NHs NHPch1, NHPch2 y NHPch3 exhiben concentraciones inhibitorias mínimas muy bajas contra *A. niger*, con valores de 0,008 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,012 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,011 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Esto sugiere una alta eficacia de estos NHs en la inhibición del crecimiento del hongo. Por otro lado, NHPa1, NHPa2 y NHPa3 también muestran una actividad significativa, con concentraciones inhibitorias mínimas de 0,025 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,031 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,043 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Estos resultados indican una consistente capacidad antifúngica de los NHs derivados de *P. atropurpurascens*.

Tabla 12. CIM de los NHs frente a *A. niger* y *F. graminearum*.

Nanohíbridos (NHs)	CIM <i>Aspergillus niger</i> (µg/mL)	CIM <i>Fusarium graminearum</i> (µg/mL)
NH Pch1	0,008	0,002
NH Pch2	0,012	0,012
NH Pch3	0,011	0,001
NH Pa1	0,025	0,025
NH Pa2	0,031	0,310
NH Pa3	0,043	0,043
NH Th1	0,027	0,027
NH Th2	0,025	0,013
NH Th3	0,050	0,025

Al evaluar la actividad antifúngica contra *F. graminearum*, se observa que los NHPch1, NHPch2 y NHPch3 también presentan una eficacia notable, con concentraciones inhibitorias mínimas de 0,002 µg/mL, 0,012 µg/mL y 0,001 µg/mL, respectivamente.

Comparando estos resultados primarios de actividad antifúngica frente a dos fitopatógenos se observa que los NHTh muestran, en general, una actividad antifúngica con concentraciones inhibitorias mínimas ligeramente más altas en comparación con los NHPa y los NHPch.

Además, es relevante para el objetivo del trabajo comparar las actividades de los NHs (Tabla 12) con las de las Ag/AgCINPs solas (Tabla 10). Se observa que con NHPch1 la actividad frente *A. niger* no muestra diferencia (PchNPs 0,010 µg/mL, NHPch 0,008 µg/mL), pero frente a *F. graminearum* mejora su actividad (PchNPs 0,026 µg/mL, NHPch 0,002 µg/mL). Para el caso de los NHPa la CIM baja frente *A. niger* (PaNPs 0.180 µg/mL, NHPa, 0,025 µg/mL) y fue muy similar frente a *F. graminearum* (PaNPs 0.046 µg/mL, NHPa 0,025 µg/mL). En el caso de las

ThNPs y los NHTh los resultados fueron muy similares frente a ambos fitopatógenos (ThNPs 0,044 $\mu\text{g/mL}$, NHTh 0,027 $\mu\text{g/mL}$; ThNPs 0,023 $\mu\text{g/mL}$, NHTh 0,027 $\mu\text{g/mL}$). En resumen, los resultados de este estudio indican que los NHs, exhiben propiedades antifúngicas prometedoras contra *A. niger* y *F. graminearum* y, especialmente los NHPch y NHPa, con CIM menores que las AgNPs solas.

Por otra parte, dado que no hubo diferencias significativas en la actividad antifúngica en las tres condiciones de síntesis de los NHs con cada Ag/AgCINPs, para continuar la investigación se seleccionaron, en base a los resultados de caracterización y para comparar NHs en iguales condiciones de síntesis, los tres NHs sintetizados con menor concentración de CS (NHPch1, NHPa1 y NHTh1). Para ello se amplió la evaluación de actividad antifúngica frente a otros fitopatógenos como se describe a continuación.

En la Tabla 13, se muestran los resultados obtenidos de la eficacia antifúngica de los NHs, frente a *P. oryzae* y *P. expansum*, mostrando nuevamente valores de CIM muy bajos (entre 0,008 y 0,028 $\mu\text{g/mL}$). Aunque NHPa1 presenta una eficacia ligeramente inferior frente a *P. expansum*, no se observan diferencias significativas entre los NH.

Tabla 13. Concentración Inhibitoria Mínima de los NHPch1, NHPa1 y NHTh1, frente a *P. oryzae* y *P. expansum*.

Microorganismos	CIM NH Pch1 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM NH Pa1 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM NH Th1 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Pyricularia oryzae</i>	0,008	0,014	0,010
<i>Penicillium expansum</i>	0,008	0,028	0,015

Asimismo, al comparar las actividades antifúngicas de los NHs (Tabla 13) con las de las Ag/AgCINPs solas (Tabla 10) se observan algunas diferencias. Si bien en el caso de los NHPch1 la actividad frente a *P. oryzae* no muestra diferencia (PchNPs 0,007 $\mu\text{g/mL}$, NHPch 0,008 $\mu\text{g/mL}$), frente a *P. expansum* aumenta levemente la actividad para los NH (PchNPs 0,015 $\mu\text{g/mL}$, NHPch 0,008 $\mu\text{g/mL}$). Para NHPa la CIM baja frente a *P. oryzae* (PaNPs 0,091 $\mu\text{g/mL}$,

NHPa 0,014 $\mu\text{g/mL}$ y levemente frente a *P. expansum* (PaNPs 0,046 $\mu\text{g/mL}$ y NHPa 0,028 $\mu\text{g/mL}$). En el caso de los NHTh los resultados fueron muy similares frente a ambos fitopatógenos, mostrando CIM levemente más bajas que las ThNPs (ThNPs 0,023 $\mu\text{g/mL}$, NHTh 0,010 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. oryzae*; ThNPs 0,022 $\mu\text{g/mL}$, NHTh 0,015 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. expansum*).

En resumen, teniendo en cuenta todos los resultados (Tabla 12 y Tabla 13), los NHs seleccionados son adecuados para aplicaciones que requieren un amplio espectro de actividad antifúngica, siendo NHPch1 el que mostró mayor actividad antifúngica. Finalmente, al enfrentar los fungicidas comerciales (Tabla 14) a las NPs biogénicas y los NHs, se destaca que tanto los nanosistemas como los fungicidas comerciales exhiben actividad antifúngica contra los fitopatógenos evaluados. Sin embargo, los nanosistemas, especialmente las NPs biogénicas y los NHs de CS-NPs (en especial los NHPch y NHPa), muestran CIM considerablemente más bajos en comparación con los fungicidas comerciales. Esto sugiere que los nanosistemas pueden ser más efectivos para inhibir el crecimiento de los patógenos en concentraciones más bajas. Este logro resalta el potencial innovador de las NPs biogénicas y los NHs como soluciones altamente efectivas para combatir enfermedades en plantas, superando en eficacia a los fungicidas tradicionales.

Tabla 144. CIM de fungicidas comerciales frente *A. niger*, *F. graminearum*, *P. oryzae* y *P. expansum*.

Fungicidas	CIM <i>Aspergillus niger</i> ($\mu\text{g/mL}$)	CIM <i>Fusarium graminearum</i> ($\mu\text{g/mL}$)	CIM <i>Pyricularia oryzae</i> ($\mu\text{g/mL}$)	CIM <i>Penicillium expansum</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Tebuconazole	1,953	1,953	1,953	7,813
Metconazole	0,391	0,391	0,195	0,391

Determinación de inhibición de crecimiento del micelio de hongos patógenos de arroz y cebolla de los NMs

De acuerdo a los promisorios resultados obtenidos en los ensayos de CIM, se examinó la capacidad de los NMs (Ag/AgClNPs biogénicas, CSNPs y NHs) de inhibir el crecimiento en

placa del micelio de los patógenos no esporulados del arroz (*Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*) y de la cebolla (*Botrytis squamosa*). Con este fin, se sembraron placas con diferentes concentraciones de NMs incorporados en el medio sólido, utilizando un disco de micelio fresco como inóculo. El diámetro del crecimiento micelial en el medio PDA (sin NMs) se tomó como control, representando el 100% de crecimiento (0% de inhibición), como se explicó en Métodos.

Los resultados fueron expresados como CE50 (la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de micelio) obtenido mediante regresión lineal (coeficiente de correlación > 0.95) del valor de inhibición relativa transformado por probit y el log₁₀ de la concentración del antifúngico (Tian et al., 2019).

CS y CSNPs

Los resultados de CE50 de la solución de CS frente a los tres fitopatógenos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. CE50 de la solución de CS frente a fitopatógenos de arroz y cebolla.

FITOPATÓGENOS	CE50 Sln CS
<i>Sclerotium oryzae</i>	0,05 mg/mL
<i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i>	3,96 mg/mL
<i>Botrytis squamosa</i>	3,02 mg/mL

Para la selección de las CSNPs a utilizar en este ensayo (CSNPs C) se tuvieron en cuenta los resultados de CIM (que no mostraron diferencias en la actividad antifúngica) y los resultados de caracterización de las CSNPs como se explicó anteriormente (por ejemplo, tamaño, menor PDI). Se observó que dichas CSNPs solamente causaron inhibición del crecimiento del hongo *S. oryzae* (15 % de inhibición a 0,4 mg/ml). Debido al bajo porcentaje de inhibición observado

por las CSNPs no se logró determinar la CE50. A modo comparativo, la solución de CS a dicha concentración (0,4 mg/ml) produjo 60 % de inhibición del crecimiento de *S. oryzae*.

Ag/AgClNPs y NHs

En la Tabla 16 se muestran los CE50 de las NPs biogénicas PchNPs, PaNPs, ThNPs y de los NHs NHPch, NHPa y NHTh, frente a los tres fitopatógenos.

Tabla 16. CE50 de las AgNPs biogénicas y de los NH frente a fitopatógenos de arroz y cebolla.

FITOPATÓGENOS	CE50	CE50	CE50	CE50	CE50	CE50
	[µg/mL] PchNPs	[µg/mL] PaNPs	[µg/mL] ThNPs	[µg/mL] NH Pch	[µg/mL] NH Pa	[µg/mL] NH Th
<i>Sclerotium oryzae</i>	NI	ND	0,28	0,05	0,26	0,30
<i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i>	0,62	3,80	ND	0,60	1,27	0,69
<i>Botrytis squamosa</i>	0,5	NI	0,72	0,20	ND	0,13

ND: no determinado.

NI: no inhibió.

Similar a lo obtenido en algunos resultados de actividad antifúngica de CS, debido al bajo porcentaje de inhibición observado, en algunos casos no se logró determinar por regresión lineal la CE50. Por ejemplo, las PaNPs a 0,73 µg/mL mostraron una inhibición del 6% frente a *Sclerotium oryzae*. En el caso de ThNPs a 0,09 µg/mL mostraron inhibición del 13% frente a *Rhizoctonia oryzae-sativae*. Y, por último, los NHPa a 0,11 µg/mL mostraron inhibición del 17% frente a *Botrytis squamosa*.

Por otro lado, las PchNPs y las PaNPs no mostraron a las condiciones evaluadas inhibición del crecimiento de *S. oryzae* ni de *B. squamosa*, respectivamente.

Para realizar una mejor comparación de la actividad antifúngica de las Ag/AgClNPs y los NHs frente a los tres fitopatógenos se decidió expresar el porcentaje de inhibición alcanzado a una misma concentración de nanomaterial ($\approx 0,10$ µg/mL) como se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Comparación de porcentajes de inhibición producidos por los nanosistemas a la misma concentración ($\approx 0,10 \mu\text{g/mL}$) frente a los fitopatógenos de arroz y cebolla.

FITOPATÓGENOS	PchNPs	PaNPs	ThNPs	NH Pch	NH Pa	NH Th
<i>Sclerotium oryzae</i>	0%	0%	21 \pm 0 %	61 \pm 4,9 %	33 \pm 1,4 %	31 \pm 1,4 %
<i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i>	25 \pm 0,7 %	5 \pm 1,4 %	31 \pm 7,1 %	31 \pm 7,1 %	18 \pm 1,4 %	28 \pm 0 %
<i>Botrytis squamosa</i>	31 \pm 4,2 %	0%	44 \pm 7,8 %	44 \pm 7,8 %	18 \pm 1,4 %	35 \pm 1,4 %

\pm indica la desviación estándar

La efectividad de los NMs frente a *Sclerotium oryzae*, nos muestra que los NHs NHPch y NHPa muestran una alta actividad inhibitoria con porcentajes de inhibición del 61% y 33%, respectivamente. Las ThNPs también muestran una notable actividad, con un porcentaje de inhibición del 21%. Por otro lado, las PaNPs y PchNPs no muestran actividad contra este fitopatógeno a esta concentración.

Con respecto a la efectividad de los NMs frente a *Rhizoctonia oryzae-sativae*, se observa que casi todos los sistemas evaluados presentan una efectividad en el rango de 18 a 31 %, excepto las PaNPs que mostraron sólo un 5% de inhibición.

Por otro lado, frente a *Botrytis squamosa*, las ThNPs y los NHPch muestran una efectividad similar con porcentajes de inhibición del 44%. Las PchNPs y los NHTh también inhibieron el crecimiento fúngico 31% y 35%, respectivamente. Como ya se mencionó previamente, las PaNPs no mostraron actividad contra este fitopatógeno en ninguna de las condiciones evaluadas.

En general, los resultados obtenidos demuestran que tanto las Ag/AgClNPs como los NHs son capaces de inhibir el crecimiento de los fitopatógenos. Estos resultados sugieren que los NHs y las NPs biogénicas podrían ser prometedores para su uso como agentes antifúngicos en la agricultura, especialmente en la gestión de enfermedades causadas por estos fitopatógenos específicos.

Teniendo en cuenta el objetivo de esta tesis es relevante destacar que los NHPa y NHPch mostraron mayores porcentajes de inhibición del crecimiento que las PaNPs y las PchNPs, respectivamente, para los tres fitopatógenos evaluados. Esta mejora en la actividad de los NH no fue observada para el caso de los NHTh y las ThNPs.

5.2.2 Discusión

Las infecciones por hongos en los cultivos representan una amenaza significativa para la seguridad alimentaria a nivel mundial. Esto se debe a la disminución en la producción y calidad de los granos, así como a la contaminación de piensos para animales y productos destinados al consumo humano (Mondéjar-López et al., 2023). Dada la dificultad asociada con el control químico y la creciente presión social para reducir el uso de pesticidas, se ha observado un aumento en la atención global hacia métodos y estrategias alternativas de protección integrada. A pesar de los numerosos esfuerzos de investigación, los productos de control biológico contra fitopatógenos a menudo son limitados. Históricamente, el control biológico de enfermedades en plantas se consideraba un eslabón débil en las estrategias de manejo integrado en ciertos cultivos. Sin embargo, en los últimos años, ha habido un impulso significativo en el desarrollo y uso de biopesticidas.

En este contexto, el uso de NPs es una alternativa novedosa para controlar hongos fitopatógenos en la agricultura, ya que han demostrado una alta actividad antifúngica frente a una amplia diversidad de hongos fitopatógenos (Arciniegas-Grijalba et al., 2017; Medda et al., 2015). Varios factores influyen en su actividad antifúngica, como la distribución del tamaño, la forma, la composición, la cristalinidad, la aglomeración y la química de la superficie de las NPs (Kasana et al., 2017; Koduru et al., 2018).

En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de las AgNPs biogénicas, las CSNPs y los NH frente a fitopatógenos de interés agrícola, como *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*, *Pyricularia oryzae*, *Aspergillus niger*, *Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Botritis squamosa*, mostrando resultados prometedores.

Las AgNPs biogénicas y los NHs mostraron alta actividad antifúngica con bajas concentraciones de tratamiento. Las ThNPs fueron capaces de inhibir el crecimiento de los

siete hongos evaluados demostrando un amplio espectro de acción antifúngico, y además confirmando los resultados obtenidos previamente frente a los fitopatógenos *F. graminearum*, *P. oryzae*, *S. oryzae* y *R. oryzae-sativae* (Sanguiniedo et al., 2023).

En particular, los NHPch y NHPa mostraron un mayor potencial antifúngico que las PchNPs y las PaNPs. Esto se puede atribuir a múltiples características de los NMs, como la carga o el tamaño, que determinan sus interacciones con las células fúngicas. Por ejemplo, las diferencias en la carga positiva superficial de los NHs podrían permitirles una mayor interacción con la carga negativa de las membranas celulares fúngicas, alterando su estructura, según informes anteriores (Barabadi et al., 2020; Fan et al., 2018; Kulikouskaya et al., 2022; Mondéjar-López et al., 2023; Vásquez et al., 2023). Kulikouskaya et al., consideran que la atracción electrostática entre las células microbianas cargadas negativamente y los NMs cargados positivamente es importante para su actividad antimicrobiana. Esta unión del CS a la pared celular microbiana cargada negativamente puede causar la alteración de la célula, así como mejorar la eficacia del antimicrobiano en el nanocompuesto. Además, uno de los posibles mecanismos de acción antimicrobiano de las AgNPs implica su unión a la superficie de la membrana celular perturbando la permeabilidad, integridad y funciones de respiración de la célula. Por lo tanto, alterar la permeabilidad de la membrana bajo la acción de las NPs de CS-plata promueve la penetración en la célula microbiana, lo que resulta en un efecto antimicrobiano mejorado (Kulikouskaya et al., 2022).

En el caso de la evaluación antifúngica de las CSNPs sintetizadas en esta tesis, estas no mostraron inhibición del crecimiento de los fitopatógenos en las condiciones evaluadas. Sin embargo, es relevante considerar que las concentraciones de CSNPs evaluadas en esta tesis fueron iguales o menores a 0,090 mg/ml, muy inferiores a lo reportado en bibliografía. Por ejemplo, Ing et al. (2012b) investigaron la actividad antifúngica de CSNPs derivadas de CS de bajo peso molecular (70 kDa) y alto peso molecular (310 kDa) contra *Candida albicans*, *Fusarium solani* y *Aspergillus niger*. Encontraron que las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de CSNPs de bajo y alto peso molecular contra *C. albicans* y *F. solani* fueron de 0,3–1,2 mg/mL y 0,6–1,2 mg/mL, respectivamente. Sin embargo, la CIM para ambos tipos de CS fue de 3 mg/mL, lo que sugiere una actividad significativamente menor en

comparación con las CSNPs (Ing et al., 2012b). Es relevante señalar que las CSNPs derivadas de CS de alto peso molecular inhibieron el crecimiento de *A. niger*, mientras que las de bajo peso molecular no tuvieron efecto. Los tamaños de las CSNPs a partir de CS de bajo peso molecular variaron de 174 a 255 nm, con un potencial zeta de +39 a +48 mV, mientras que las de alto peso molecular variaron de 201 a 301 nm, con un potencial zeta de +40 a +54 mV. Solo una clase de CSNPs, con un tamaño de 300 nm y un potencial zeta de +54 mV, inhibió el crecimiento de *A. niger* (Ing et al., 2012b). Estos resultados concuerdan con el trabajo previo de Qi et al. (2004), que demostraron que las CSNPs exhiben una mayor actividad antimicrobiana debido a su tamaño reducido, alta carga superficial y capacidad para interactuar eficazmente con la membrana plasmática de los hongos. La capacidad de las CSNPs para penetrar en las células fúngicas y perturbar la síntesis de ADN y ARN se ha destacado como un mecanismo clave de su actividad antifúngica (Qi et al., 2004). Nguyen Van et al. (2013) evaluaron las CSNPs frente a hongos fitopatógenos y encontraron una inhibición significativa del crecimiento micelial *in vitro*. Las CSNPs mostraron una mayor efectividad en comparación con la solución de CS, atribuyéndolo al pequeño tamaño de las CSNPs y su capacidad de atravesar las membranas biológicas (Nguyen Van et al., 2013). Asimismo, Saharan et al. (2013) observaron que las CSNPs inhibieron el crecimiento de *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani* de manera más efectiva que el CS en solución, siendo la concentración más efectiva de CSNPs 1mg/ml (Saharan et al., 2013).

En resumen, según lo informado en estudios previos es esperable que las CSNP tengan mayor actividad antifúngica que el CS en solución. Sin embargo, de acuerdo a algunos resultados comparables obtenidos (MIC frente a *F. graminearum* o porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. oryzae*) la solución de CS sería más activa que las CSNPs sintetizadas en esta tesis. Esto podría deberse a múltiples factores tales como las características del CS (por ejemplo, peso molecular), o de las CSNPs sintetizadas (por ejemplo, carga superficial). Los potenciales Z medidos para las CSNPs fueron alrededor de +20 mV (menores a los reportados), lo que puede significar una menor interacción con las células fúngicas (Kheiri et al., 2016).

Otro aspecto de gran relevancia, abordado en la Introducción de esta tesis, es el desarrollo de resistencia a los fungicidas comerciales debido a su uso indiscriminado y generalizado, lo que contribuye a la problemática mundial de la resistencia a antimicrobianos con impacto en la salud humana, animal y ambiental. Es en parte por este motivo que existen numerosas investigaciones las cuales evalúan los efectos de los fungicidas comerciales sobre los fitopatógenos emergentes en cultivos. Por ejemplo, Kafle et al. (2021), evaluaron 10 diferentes fungicidas contra el patógeno *Pyricularia oryzae* que causa la enfermedad de la podredumbre en el arroz. Evaluaron dos concentraciones 50 µg/mL y 100 µg/mL, de los siguientes fungicidas, a saber, Dithane M-45 (Mancozeb 75%W.P), Bavistin (Carbendazim 50% W.P), Antracol (Propineb 70%W.P), Diamethmorph 50%WP, Sectin (Fenamidona 10% + Mancozeb 50% W.G), Protector ZN (Clorotalonil 75% W.P), Safaya (Carbendazim 12% + mancozeb 63% W.P), Nativo 75% W.G (Tebuconazol 50% + Trifloxistrobin 25% W.G) y Topcare (Azoxistrobin 50% W.D.G), obteniendo resultados entre 13 % (50 µg/mL) y 100 % (100 µg/mL) de inhibición del crecimiento del patógeno. Asimismo, Ivić et al. (2011) evaluaron cinco fungicidas (carbendazim, tebuconazol, flutriafol, metconazol y procloraz) en la inhibición del crecimiento micelial de 25 aislados de *Fusarium* spp.. Se compararon las EC50 entre especies y fungicidas, mostrando los siguiente resultados: frente al *F. graminearum*: carbendazim (390-1410 µg/mL), tebuconazol (850-2570 µg/mL), metconazol (1660 µg/mL). *F. avenaceum*: carbendazim (910-1350 µg/mL), tebuconazol (850-11580 µg/mL), metconazol (560 µg/mL). *F. verticillioides*: carbendazim (470-600 µg/mL), tebuconazol (220-850 µg/mL) metconazol (170 µg/mL). Otro ejemplo recientemente publicado por Mondéjar-López et al. (2023), fue el estudio del efecto del fungicida tebuconazol frente a cuatro fitopatógenos, obteniéndose los siguientes resultados de CIM: 500 µg/mL frente a *F. oxysporum* y *A. versicolor*, 1000 µg/mL frente a *A. niger* y *A. brasiliensis*.

Estos resultados, juntos con los obtenidos en este trabajo de tesis, nos muestra el potencial que tiene las NPs biogénicas, pero sobre todo los NHs, para inhibir el crecimiento de fitopatógenos a muy bajas concentraciones. Además, estos productos biotecnológicos están constituidos de compuestos naturales. Esta diferencia en la naturaleza de los agentes y de

las muy bajas concentraciones a emplear, pueden influir en su eficacia, seguridad y potencial impacto ambiental.

5.3 Evaluación del efecto de los NMs en la germinación de semillas de trigo y arroz.

5.3.1 Resultados

Los ensayos de semillas *in vitro* permitieron evaluar el efecto de NPs en la germinación de semillas de trigo y arroz, proporcionando datos valiosos para su potencial aplicación en el sector agrícola.

Al comparar los porcentajes de germinación de semillas de trigo tratadas con las semillas control, no se encontró un efecto negativo (de toxicidad) debido a los tratamientos (Figura 34, Figura 35 y Figura 36). Aunque no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, en algunos se observan leves diferencias en los porcentajes de germinación. Por ejemplo, las semillas tratadas con NHTh1 mostraron una tendencia a incrementar la germinación (Figura 34), lo que indica un posible efecto beneficioso de este tratamiento en particular.

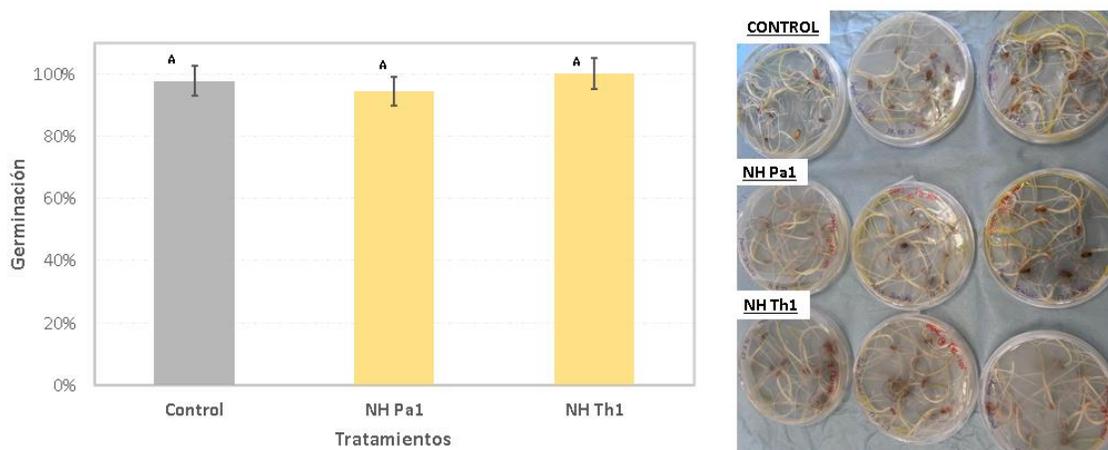


Figura 34. Tratamientos a las semillas de trigo con los NHPa1 y NHTh1, comparados con el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

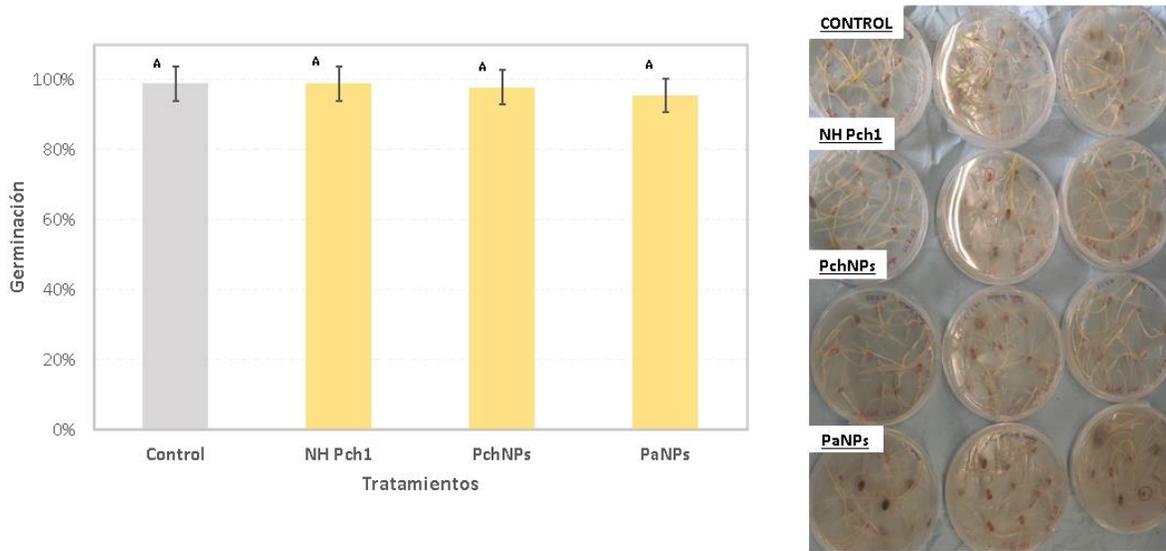


Figura 35. Tratamientos a las semillas de trigo con NHPch1, PchNPs y PaNPs, comparados con el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

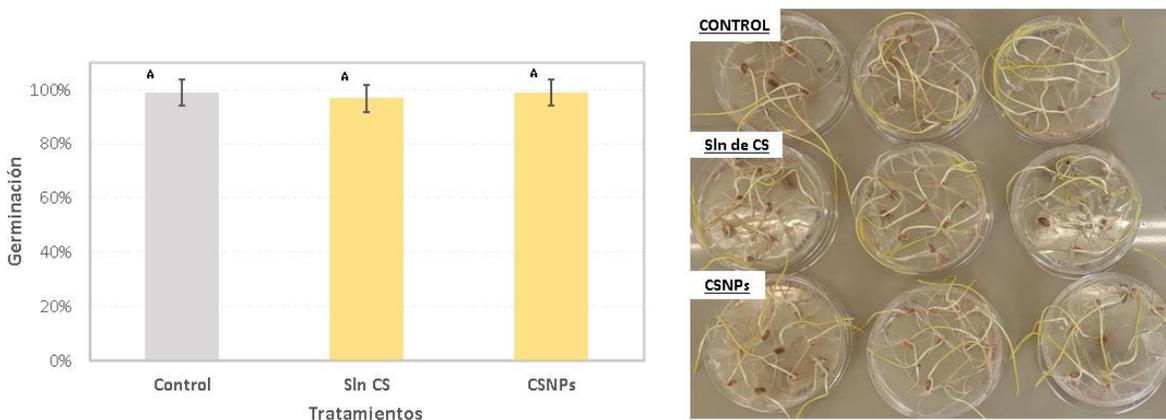


Figura 36. Tratamientos a las semillas de trigo con la solución de CS y las CSNPs, comparados con el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Los porcentajes de germinación de semillas de arroz se muestran en las Figura 37 y 38, observándose que, al igual que en semillas de trigo, ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas con respecto al control. Para el caso del arroz, solo se mostraron los resultados de las nanopartículas de plata biogénicas y de los nanohíbridos, no fue necesario realizar el ensayo con las nanopartículas de quitosano, debido a que, en los ensayos con semillas de trigo, no se observó efectos negativos. Además, los ensayos en semillas

principalmente se realizaron para evaluar el efecto de los nanosistemas a base de plata, debido a que este elemento suele ser tóxico a ciertas concentraciones.

Los resultados de estos estudios son promisorios ya que una vez más demuestran que los NMs no producen efecto negativo en la germinación de la semilla, pudiendo contribuir al control de fitopatógenos como se demostró en la sección 5.3 de esta tesis.

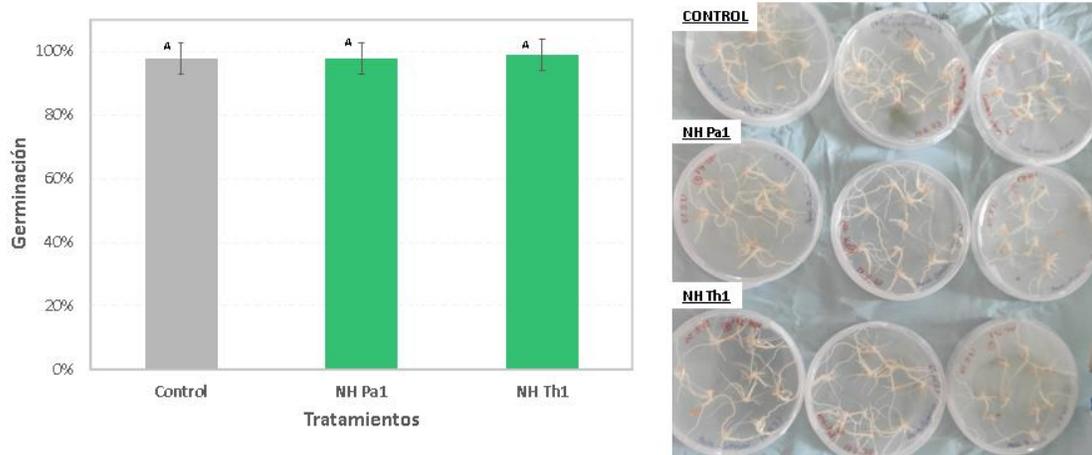


Figura 37. Tratamientos a las semillas de arroz con los NHPa1 y NHTh1, comparados con el control (sin tratamiento). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

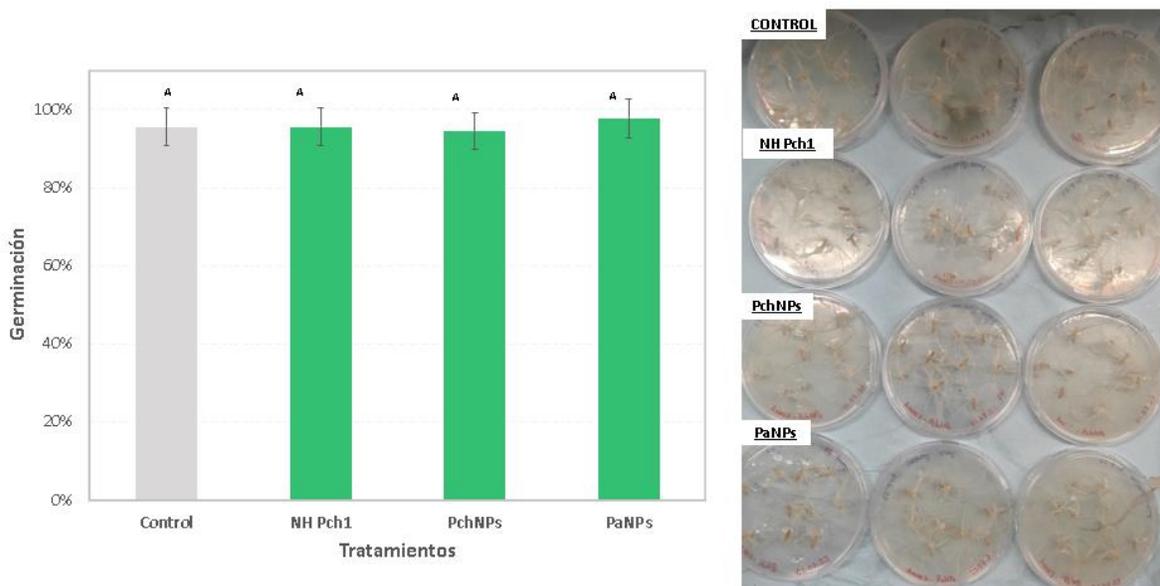


Figura 38. Tratamientos a las semillas de arroz con NHPch1, PchNPs y PaNPs, comparados con el control (sin tratamiento). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

5.3.2 Discusión

Para el uso de antifúngicos novedosos en agricultura y en particular NMs que contienen plata, es imprescindible descartar sus posibles efectos fitotóxicos. En este sentido, el uso de NMs provenientes de recursos verdes surge como una alternativa promisoría. En este estudio se evaluó el efecto de los nanosistemas sobre la germinación de semillas de arroz y trigo, comparando las semillas tratadas con los NMs (a concentraciones que en general mostraron un efecto antifúngico), con las semillas no tratadas (control). En todos los casos, los porcentajes de germinación fueron superiores al 98 %, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos y los controles. Estos indicios demuestran que no hay un efecto fitotóxico observable del tratamiento durante la germinación. Resultados similares fueron reportados en semillas de trigo tratadas con NHs de CS-Ag (Mondéjar-López et al., 2023), preparados con AgNPs biogénicas sintetizadas con extractos de hoja de trigo y luego recubiertas con CS. En los resultados no se observaron efectos fitotóxicos en ensayos de germinación de semillas tratadas con 200 µg/mL de CS-AgNPs, y, en las primeras etapas de desarrollo de la planta se observó un aumento en los niveles de clorofila. Los autores concluyeron que el uso de NH CS-Ag podría ser una alternativa potencial para la prevención de infecciones fúngicas en las primeras etapas del desarrollo del cultivo de trigo.

Aunque en los resultados de esta tesis no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, las semillas tratadas con NHTh1 mostraron una tendencia a incrementar la germinación, lo que indica un posible efecto beneficioso de este tratamiento en particular. Este resultado es comparable al obtenido previamente por el grupo, donde si bien no observaron diferencias significativas en el estudio en semillas *in vitro*, sí se obtuvo un incremento de la germinación de plantas a partir de semillas de trigo tratadas con ThNPs (Sanguineto et al., 2023).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que el tratamiento de semillas con CSNPs puede generar efectos positivos en el desarrollo de la planta. Por ejemplo, Sathiyabama & Parthasarathy (2016) reportaron que semillas de garbanzo tratadas con CSNPs mostraron un aumento en el porcentaje de germinación, longitud de la raíz y del brote, índice de vigor de

la semilla y biomasa vegetativa de las plántulas. Divya et al. (2019) estudiaron el efecto del tratamiento de semillas de arroz con 500 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CSNPs en la germinación, observando que la capacidad de inducción del crecimiento de las plántulas estaba asociado a la concentración y al tiempo de exposición de las semillas a las CSNPs. Si bien en esta tesis las CSNPs sintetizadas no mostraron ni actividad antifúngica ni un incremento de la germinación de semillas en las condiciones evaluadas, no se descarta la posibilidad de obtener mejores resultados en futuros ensayos con CSNPs obtenidas en otras condiciones de síntesis (como, por ejemplo: empleando CS de muy bajo peso molecular) y realizando nuevos ensayos de germinación de semilla y desarrollo de plantas.

*5.4 Evaluación de inducción de resistencia a *Botrytis squamosa* en plantas de cebolla por los NMs*

5.4.1 Resultados

Para la evaluación de inducción de resistencia se asperjaron las plantas (con los inductores a evaluar y con agua). Luego de 72 hs se inocularon con *B. squamosa*, como se describió en Materiales y métodos.

Los inductores evaluados fueron CSNPs, NHPch (NH seleccionado por su promisorio potencial antifúngico en los resultados presentados previamente), solución de CS (CS–Sigma y CS en Biorend®CS). Se incubó a 17°C con un régimen de luz de 12 horas. Se tomaron muestras de 6 o 5 plantas por tratamiento a los 8 días. Se realizó evaluación de síntomas según área afectada en tercera y cuarta hoja más joven, 8 días después de la inoculación.

En la Figura 39, se muestran las manchas foliares producidas por el patógeno *B. squamosa* en las hojas (tercera hoja) de plantas de cebollas. Se observa que el control tiene mayor número de manchas en comparación al resto, presentando las tratadas con Biorend® menos manchas que los demás tratamientos. Al determinar el porcentaje de área infectada en cada una de las hojas (Figura 39f) los resultados muestran que el control tuvo el mayor porcentaje, seguido por las tratadas con CSNPs con 1,9 %. Sin embargo, las tratadas con NHPch presentaron sólo un 1,2 % mientras que las tratadas con Biorend® fue de 0,8 %.

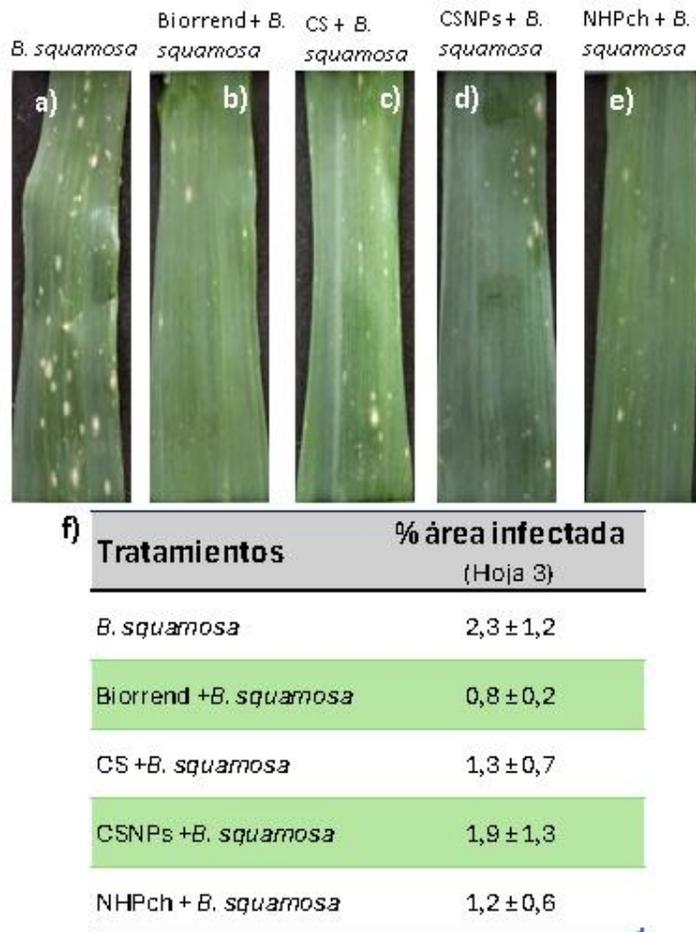


Figura 39. Comparación de manchas foliares de la tercera hoja de plantas de cebollas infectadas con el patógeno *B. squamosa* y tratadas con b) Biorend®, c) solución de CS, d) CSNPs y e) NHPch. El porcentaje promedio de área infectada por cada tratamiento y su desviación estándar se muestra en f).

En la Figura 40, se muestra la comparación de los datos recolectados del porcentaje de área infectada de cada uno de los tratamientos con las plantas control y su evaluación estadística. Se observa que todos los tratamientos evaluados, excepto el tratamiento con CSNPs, muestran diferencias significativas en el porcentaje de área infectada.

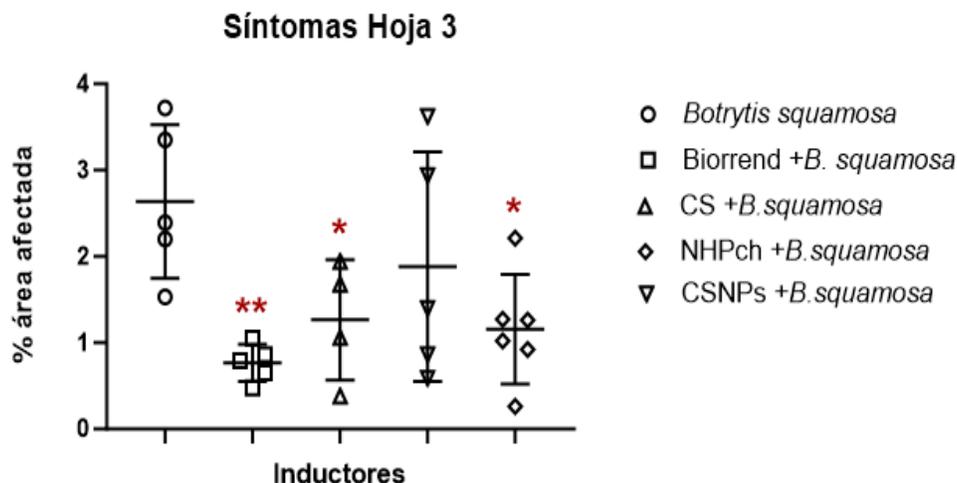


Figura 40. Comparación del % de área infectada con *B. squamosa* de cada uno de los tratamientos en la hoja 3. Se indican con * diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Los resultados obtenidos para la cuarta hoja de las plantas de cebollas infectadas, se muestran en las Figura 41 y 42. En este caso se observa que todos los tratamientos aplicados, incluyendo las CSNPs, redujeron el porcentaje de área infectada en comparación con el grupo control (Figura 41). Los datos muestran que el tratamiento con NHPch presentó el porcentaje más bajo de infección, con un valor medio de $2,1 \pm 1,2$. Esto sugiere que la combinación de CS-NPs biogénicas podría tener un efecto altamente efectivo en la supresión de la infección por *Botrytis squamosa* en las plantas de cebolla.

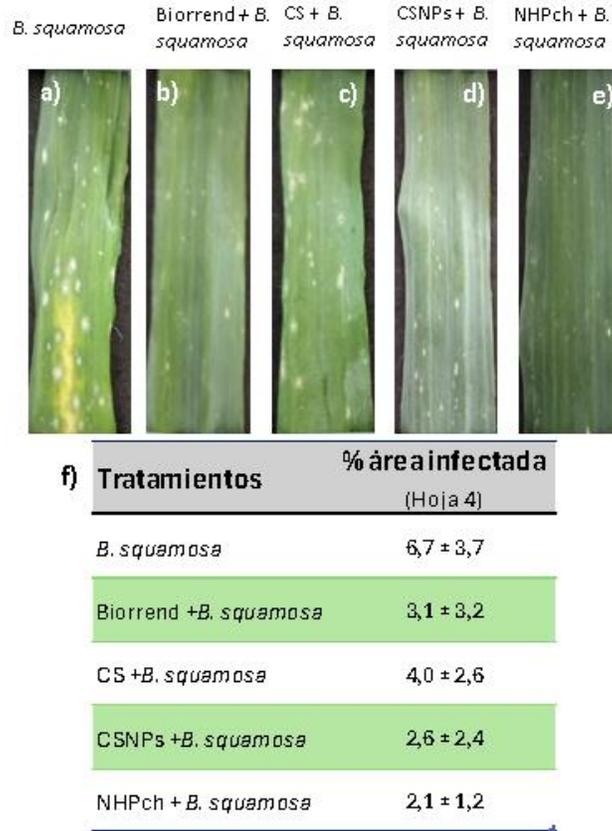


Figura 41. Comparación de manchas foliares de la cuarta hoja de plantas de cebollas infectadas con el patógeno *B. squamosa* y tratadas con b) Biorrend, c) solución de CS, d) CSNPs y e) NHPch, f) muestra el porcentaje de área infectada por cada tratamiento.

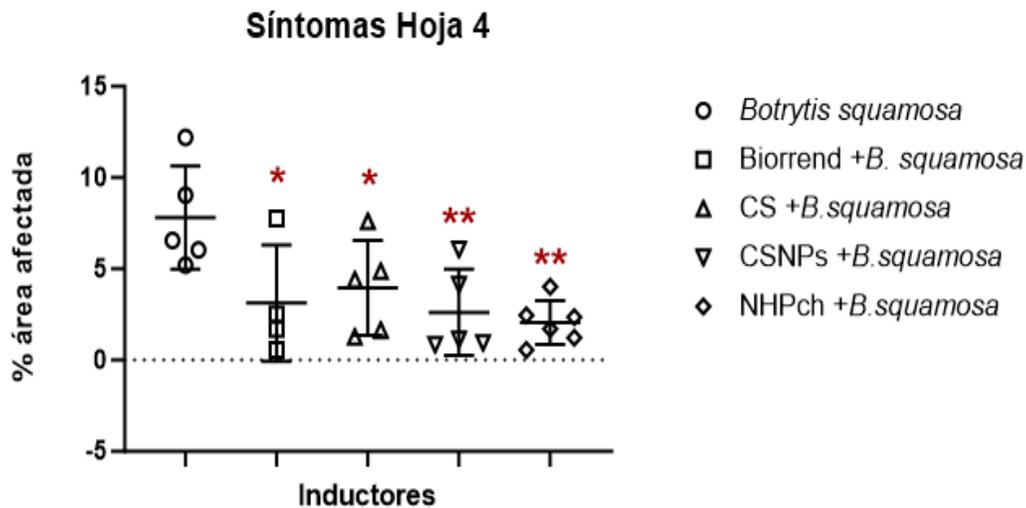


Figura 42. Comparación del % de área infectada con *B. squamosa* de cada uno de los tratamientos en la hoja 4. Se indican con * diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

El análisis estadístico realizado se muestra en la Figura 42. El mismo reveló diferencias significativas entre el grupo control (*B. squamosa*) y cada uno de los tratamientos aplicados. Además, se encontraron diferencias entre los tratamientos, ya que las plantas tratadas con los NMs CSNPs y NHPch presentaron mayor diferencia significativa en el porcentaje de área afectada con respecto a las plantas control que el resto de los tratamientos.

Estos hallazgos respaldan la eficacia de los tratamientos probados en la reducción de la infección por *Botrytis squamosa* en plantas de cebolla. Además, sugieren que los NHs de CS-NPs biogénicas (NHPch) podrían ser una opción especialmente prometedora para el control de esta enfermedad debido al bajo porcentaje de infección observado en estos experimentos.

Con respecto a la comparación entre hojas, el porcentaje de infección fue mayor en la hoja 4 (Figura 41) que en la hoja 3 (Figura 39) tanto en las plantas control como en las tratadas.

5.4.2 Discusión

Como se mencionó en la Introducción, el uso excesivo e indiscriminado de agroquímicos para el control de fitopatógenos en cultivos como cebolla, ha generado preocupaciones sobre su impacto negativo en el medio ambiente, la salud humana y la resistencia de los patógenos (Steentjes et al., 2021). La infección por *Botrytis squamosa* representa una amenaza significativa para la producción de cebolla en todo el mundo, causando pérdidas económicas importantes debido a la disminución del rendimiento y la calidad del cultivo (Tanović et al., 2019). En este sentido, la evaluación de los NMs sintetizados en esta tesis representa una promisoriosa alternativa. Además, para este estudio en plantas de cebolla se incluyó el tratamiento con Biorend®, un producto comercial basado en CS que demostró ser eficaz como inductor de defensa en planta de cebolla para el control de *Botrytis squamosa* (Galeano et al., 2017). El CS ha demostrado ser efectivo contra una amplia gama de patógenos, incluidos hongos, bacterias y virus, y su uso en la agricultura puede contribuir a la reducción del uso de fungicidas sintéticos y sus impactos negativos asociados (Yan et al., 2023). Además de su eficacia en el control de enfermedades, estos tratamientos pueden

tener otros beneficios para la agricultura. Por ejemplo, el CS se ha demostrado que estimula el crecimiento de las plantas, mejora su resistencia al estrés abiótico y promueve la actividad de microorganismos benéficos del suelo (De Vega et al., 2021). Esto puede conducir a cultivos más saludables y resistentes, con un menor riesgo de pérdidas por enfermedades y condiciones ambientales desfavorables (De Vega et al., 2021).

En este estudio, se evaluaron varios tratamientos (CS, NHs, CSNPs) basados en CS, con el objetivo de determinar su efecto en la reducción de la infección por *Botrytis squamosa* en plantas de cebolla.

Los resultados obtenidos revelan que, en general, todos los tratamientos mostraron una disminución significativa en el porcentaje de área infectada en comparación con el control sin inductor.

Estos hallazgos son prometedores, ya que indican que los tratamientos utilizados podrían tener un potencial efecto positivo en el manejo de la enfermedad en cultivos de cebolla.

Para el caso de Biorend®, los resultados fueron consistentes con estudios previos realizados en el patosistema *B. squamosa*-cebolla donde se observó la inducción de resistencia en la planta frente al fitopatógeno no solo por la disminución de área afectada, sino también por la mayor producción de enzimas involucradas en dicha defensa (Galeano et al., 2017). Si se compara con los resultados del CS puro (CS-Sigma) se observa que el efecto en la hoja 3 no es tan marcado, sugiriendo que otros componentes presentes en el Biorend® diferentes al CS pueden estar contribuyendo también a inducir el sistema de defensa de la planta.

Por otro lado, los NMs sintetizados en esta tesis, CSNPs y NHPch también mostraron una reducción en el % de área afectada por *Botrytis squamosa*, a muy bajas concentraciones de inductor. El CS se ha reconocido ampliamente por sus propiedades antifúngicas y estimulantes del sistema inmunológico en plantas. La aplicación de CS y CSNPs podría estar actuando directamente sobre el patógeno, inhibiendo su crecimiento, o fortaleciendo la resistencia de la planta a la infección. En la literatura se ha reportado que los NMs basados en CS tienen una amplia gama de aplicaciones en agricultura sostenible, como protección de cultivos (Campos et al., 2018; Chauhan et al., 2017) y mejora del crecimiento de las plantas

(Pereira, Sandoval-Herrera, et al., 2017; Pereira, Silva, et al., 2017). Por ejemplo, se evaluó la aplicación de NPs de CS cargadas con tiamina en cuanto al crecimiento y protección de un cultivo de garbanzo. El tratamiento de las semillas aumentó la germinación, el crecimiento y la producción de ácido indolacético de las plántulas de garbanzo, en comparación con las semillas no tratadas. Además, se observó la inducción de enzimas de defensa en las hojas y raíces de las plantas después del tratamiento foliar con las NPs sintetizadas (Muthukrishnan et al., 2019).

Por otro lado, los NHPch podrían estar aprovechando las propiedades de inducción de respuesta de defensa frente al fitopatógeno, potenciando su acción. De hecho, al comparar los resultados de los dos NMs evaluados (CSNPs y NHPch), los NHPch mostraron mayor eficacia, ya que el tratamiento produjo menor % promedio de afección y además diferencias significativas con el control para ambas hojas analizadas (hoja 3 y hoja 4), mientras que el tratamiento con CSNPs mostró diferencias significativas sólo en la hoja 4. Se ha reportado que las NPs metálicas pueden proteger, así como favorecer el crecimiento y desarrollo de cultivos (Sanguñedo et al., 2023). Por ejemplo, AgNPs sintetizadas con el hongo *Trichoderma viride* se evaluaron *in vivo* para el control de *Alternaria solani*, el agente causal de la enfermedad de tizón temprano en plantas de tomate. La aplicación foliar de las AgNPs (en condiciones de invernadero) condujo a una disminución del 48,57% en el recuento de esporas fúngicas, mientras que el peso fresco y el contenido total de clorofila de las plantas aumentaron en un 32,58 y 23,52%, respectivamente, en comparación con las plantas infectadas no tratadas (Ponmurugan, 2017).

Es importante destacar que, si bien todos los tratamientos mostraron una reducción en la infección, se observaron diferencias en su eficacia entre las hojas recolectadas. La hoja 4, en general, presentó un mayor porcentaje de área infectada en comparación con la hoja 3, lo que sugiere una mayor susceptibilidad a la infección por *B. squamosa* a medida que la planta madura. Además, que la variación en la eficacia de los inductores entre las hojas podría también estar relacionada con la edad, factor a tener en cuenta en el diseño de estrategias de manejo de enfermedades.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones.

Síntesis y caracterización de NMs.

Se sintetizaron Ag/AgClNPs biogénicas y CSNPs bajo condiciones controladas. Las NPs fueron ampliamente caracterizadas por tamaño, carga, dispersidad, composición química, demostrando baja polidispersidad y estabilidad coloidal.

Se sintetizaron NHs evaluando distintas condiciones de reacción. Los NHs resultantes mostraron estabilidad y tamaños variables según la concentración de CS y el tipo de NPs biogénicas utilizadas. Los estudios de caracterización complementarios demostraron, además de sus propiedades fisicoquímicas, la exitosa formación de NHs de CS y plata.

Evaluación antifúngica frente a fitopatógenos de interés agrícola.

Tanto las AgNPs biogénicas como los NH CS-AgNPs presentaron actividad antifúngica a bajas concentraciones frente a la mayoría de los fitopatógenos evaluados.

Los NHPch y NHPa mostraron mayor actividad antifúngica que las PchNP y PaNP, respectivamente, lo que demuestra el relevante aporte de esta tesis en el desarrollo de nuevos NMs que podrían ser utilizados a muy bajas concentraciones para controlar hongos fitopatógenos en la agricultura.

Evaluación del efecto de los NMs en la germinación de semillas de trigo y arroz.

Al evaluar el efecto de los NMs sobre la germinación de semillas de arroz y trigo, no se encontraron diferencias significativas entre las semillas tratadas con las no tratadas, lo que descarta un efecto tóxico de los NMs sobre las semillas, a concentraciones a las cuales presentaron actividad antifúngica.

*Evaluación de inducción de resistencia a *Botrytis squamosa* en plantas de cebolla por los NMs*

Los tratamientos con los NMs desarrollados en esta tesis (CSNPs y NHPch) mostraron una reducción en el porcentaje de área afectada por *B. squamosa* en plantas de cebolla a muy bajas concentraciones de inductor. Además, los NHPch mostraron mayor eficacia produciendo menor porcentaje promedio de afección y diferencias significativas con el control en todas las evaluaciones. Estos resultados sugieren que estos inductores podrían ser considerados como estrategias potenciales para el manejo de la enfermedad por *B. squamosa* en cultivos de cebolla.

6.2 Perspectivas.

Teniendo en cuenta los resultados y las conclusiones de esta tesis se plantean las siguientes perspectivas:

- ❖ Realizar estudios de econanotoxicidad, evaluando los efectos de estos NMs en el suelo, el agua y sobre los organismos no objetivo.
- ❖ Realizar estudios de campo para evaluar la eficacia a mayor escala y a largo plazo de los nanosistemas en la prevención y control de enfermedades fúngicas que afectan cultivos de nuestro país como trigo, arroz y cebolla.
- ❖ Estudiar cómo estos sistemas afectan las respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas, incluida la activación del sistema de defensa de las plantas y posibles efectos en el crecimiento, la producción y la calidad de los cultivos.
- ❖ Realizar análisis económicos para evaluar la viabilidad de utilizar estos sistemas como bioinsumos que contribuyan al manejo integrado de enfermedades fúngicas en cultivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abd Elaziz, M., Almodfer, R., Ahmadianfar, I., Ibrahim, I. A., Mudhsh, M., Abualigah, L., Lu, S., Abd El-Latif, A. A., & Yousri, D. (2022). Static models for implementing photovoltaic panels characteristics under various environmental conditions using improved gradient-based optimizer. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, *52*, 102150. <https://doi.org/10.1016/J.SETA.2022.102150>
- Abdelaziz, A. M., Dacrory, S., Hashem, A. H., Attia, M. S., Hasanin, M., Fouda, H. M., Kamel, S., & ElSaied, H. (2021). Protective role of zinc oxide nanoparticles based hydrogel against wilt disease of pepper plant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *35*, 102083. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.102083>
- Agathokleous, E., Feng, Z. Z., Iavicoli, I., & Calabrese, E. J. (2020). Nano-pesticides: A great challenge for biodiversity? The need for a broader perspective. *Nano Today*, *30*, 100808. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2019.100808>
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Sisodia, R., Shakil, N. A., & Walia, S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Industrial Crops and Products*, *55*, 202–206. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.01.026>
- Ahmed, T., Ren, H., Noman, M., Shahid, M., Liu, M., Ali, M. A., Zhang, J., Tian, Y., Qi, X., & Li, B. (2021). Green synthesis and characterization of zirconium oxide nanoparticles by using a native *Enterobacter* sp. and its antifungal activity against bayberry twig blight disease pathogen *Pestalotiopsis versicolor*. *NanoImpact*, *21*, 100281. <https://doi.org/10.1016/J.IMPACT.2020.100281>
- Ajaz, S., Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Shah, A. A., Mehmood, M. A., Abbas, A., Cheema, A. I., Iqbal, M. Z., & Li, B. (2021). Bioinspired green synthesis of silver nanoparticles by using a native *Bacillus* sp. strain AW1-2: Characterization and antifungal activity against *Colletotrichum falcatum* Went. *Enzyme and Microbial Technology*, *144*, 109745. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2021.109745>

- Alamri, S. A. M., Hashem, M., Nafady, N. A., Sayed, M. A., Alshehri, A. M., & Alshaboury, G. (2018). Controllable biogenic synthesis of intracellular silver/silver chloride nanoparticles by *Meyerozyma guilliermondii* KX008616. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 917–930. <https://doi.org/10.4014/JMB.1802.02010>
- Alghuthaymi, M. A., Almoammar, H., Rai, M., Said-Galiev, E., & Abd-Elsalam, K. A. (2015). Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 221–236. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008194>
- Alharthi, S. S., Gomathi, T., Joseph, J. J., Rakshavi, J., Florence, J. A. K., Sudha, P. N., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2022). Biological activities of chitosan-salicylaldehyde schiff base assisted silver nanoparticles. *Journal of King Saud University - Science*, 34(6), 102177. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2022.102177>
- Ali, S. S., Al-Tohamy, R., Koutra, E., Moawad, M. S., Kornaros, M., Mustafa, A. M., Mahmoud, Y. A. G., Badr, A., Osman, M. E. H., Elsamahy, T., Jiao, H., & Sun, J. (2021). Nanobiotechnological advancements in agriculture and food industry: Applications, nanotoxicity, and future perspectives. *Science of The Total Environment*, 792, 148359. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148359>
- Al-Sadi, A. (2017). Impact of Plant Diseases on Human Health. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 7(2), 21–22. https://doi.org/10.4103/IJNPND.IJNPND_24_17
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137–146. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2014.10.040>
- Arafat, A., Samad, S., & Masum, S. (2015). Preparation and characterization of chitosan from shrimp shell waste. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6(5), 538–541. https://www.researchgate.net/profile/SabrinSamad/publication/282641814_Prep

aration_and_Characterization_of_Chitosan_from_Shrimp_shell_waste/links/5614cd6808aed47facee936c/Preparation-and-Characterization-of-Chitosan-from-Shrimp-shell-waste.pdf

Arciniegas-Grijalba, P. A., Patiño-Portela, M. C., Mosquera-Sánchez, L. P., Guerra Sierra, B. E., Muñoz-Florez, J. E., Erazo-Castillo, L. A., & Rodríguez-Páez, J. E. (2019). ZnO-based nanofungicides: Synthesis, characterization and their effect on the coffee fungi *Mycena citricolor* and *Colletotrichum* sp. *Materials Science and Engineering: C*, *98*, 808–825. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.01.031>

Arciniegas-Grijalba, P. A., Patiño-Portela, M. C., Mosquera-Sánchez, L. P., Guerrero-Vargas, J. A., & Rodríguez-Páez, J. E. (2017). ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) and their antifungal activity against coffee fungus *Erythricium salmonicolor*. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, *7*(5), 225–241. <https://doi.org/10.1007/S13204-017-0561-3/FIGURES/11>

Arora, S., Murmu, G., Mukherjee, K., Saha, S., & Maity, D. (2022). A comprehensive overview of nanotechnology in sustainable agriculture. *Journal of Biotechnology*, *355*, 21–41. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2022.06.007>

Asadishad, B., Chahal, S., Akbari, A., Cianciarelli, V., Azodi, M., Ghoshal, S., & Tufenkji, N. (2018). Amendment of Agricultural Soil with Metal Nanoparticles: Effects on Soil Enzyme Activity and Microbial Community Composition. *Environmental Science and Technology*, *52*(4), 1908–1918. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.7B05389/SUPPL_FILE/ES7B05389_SI_001.PDF

Awwad, A., & Amer, M. (2020). Biosynthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using *Ailanthus Altissima* Leaf Extract and Antibacterial Activity SSRN-id3554169. *Chemistry International*, *6*(4), 210–217. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3670917>

Ayaz, M.; Li, C.-H.;, Ali, Q. ;, Zhao, W. ;, Chi, Y.-K. ;, Shafiq, M. ;, Ali, F. ;, Yu, X.-Y. ;, Yu, Q. ;, Zhao, J.-T. ;, Bacterial, A., Biocontrol, F., Ayaz, M., Li, C.-H., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y.-K., Shafiq, M., Ali, F., ... Huang, W.-K. (2023). Bacterial and Fungal Biocontrol Agents for Plant Disease Protection: Journey from Lab to Field, Current Status, Challenges, and

- Global Perspectives. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 6735, 28(18), 6735.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES28186735>
- Baker, S., Volova, T., Prudnikova, S. V., Satish, S., & Prasad M.N., N. (2017). Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 53, 10–17. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2017.04.012>
- Ballottin, D., Fulaz, S., Souza, M. L., Corio, P., Rodrigues, A. G., Souza, A. O., Gaspari, P. M., Gomes, A. F., Gozzo, F., & Tasic, L. (2016). Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S11671-016-1538-Y/FIGURES/5>
- Barabadi, H., Vahidi, H., Damavandi Kamali, K., Rashedi, M., & Saravanan, M. (2020). Antineoplastic Biogenic Silver Nanomaterials to Combat Cervical Cancer: A Novel Approach in Cancer Therapeutics. *Journal of Cluster Science*, 31(4), 659–672. <https://doi.org/10.1007/S10876-019-01697-3/METRICS>
- Bayat, M., Zargar, M., Chudinova, E., Astarkhanova, T., & Pakina, E. (2021). In Vitro Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: The First Report of Applying Biogenic Nanoparticles against *Pilidium concavum* and *Pestalotia* sp. Fungi. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5402, 26(17), 5402. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26175402>
- Beyki, M., Zhavah, S., Khalili, S. T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M., & Mohsenifar, A. (2014). Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 54, 310–319. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.01.033>
- Bharathi, D., Vasantharaj, S., & Bhuvaneshwari, V. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Cordia dichotoma* fruit extract and its enhanced antibacterial, anti-biofilm and photo catalytic activity. *Materials Research Express*, 5(5), 055404. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/AAC2EF>

- Bilesky-José, N., Maruyama, C., Germano-Costa, T., Campos, E., Carvalho, L., Grillo, R., Fraceto, L. F., & De Lima, R. (2021). Biogenic α -Fe₂O₃Nanoparticles Enhance the Biological Activity of Trichoderma against the Plant Pathogen Sclerotinia sclerotiorum. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(4), 1669–1683. https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.0C07349/SUPPL_FILE/SCOC07349_SI_001.PDF
- Boland, G. J., & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of sclerotinia sclerotiorum. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 93–108. <https://doi.org/10.1080/07060669409500766/ASSET//CMS/ASSET/26CC8A63-F36B-4B29-A8FB-C5743569A273/07060669409500766.FP.PNG>
- Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., & Nelson, B. D. (2006). Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2005.00316.X>
- Bombo, A. B., Pereira, A. E. S., Lusa, M. G., De Medeiros Oliveira, E., De Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., De Jesus, M. B., Oliveira, H. C., Fraceto, L. F., & Mayer, J. L. S. (2019). A Mechanistic View of Interactions of a Nanoherbicide with Target Organism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(16), 4453–4462. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B00806/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2019-008062_0008.GIF
- Campos, E. V. R., Proença, P. L. F., Oliveira, J. L., Pereira, A. E. S., De Moraes Ribeiro, L. N., Fernandes, F. O., Gonçalves, K. C., Polanczyk, R. A., Pasquoto-Stigliani, T., Lima, R., Melville, C. C., Della Vechia, J. F., Andrade, D. J., & Fraceto, L. F. (2018). Carvacrol and linalool co-loaded in β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-26043-X>
- Carisse, O., McRoberts, N., & Brodeur, L. (2008). Comparison of monitoring- and weather-based risk indicators of botrytis leaf blight of onion and determination of action

Bibliografía

- thresholds. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30(3), 442–456. <https://doi.org/10.1080/07060660809507542>
- Chakraborty, P., & Krishnani, K. K. (2022). Emerging bioanalytical sensors for rapid and close-to-real-time detection of priority abiotic and biotic stressors in aquaculture and culture-based fisheries. *Science of The Total Environment*, 838, 156128. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156128>
- Chauhan, N., Dilbaghi, N., Gopal, M., Kumar, R., Kim, K. H., & Kumar, S. (2017). Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 616–624. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.12.059>
- Chen, J., Wu, L., Lu, M., Lu, S., Li, Z., & Ding, W. (2020). Comparative Study on the Fungicidal Activity of Metallic MgO Nanoparticles and Macroscale MgO Against Soilborne Fungal Phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11, 511894. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00365/BIBTEX>
- Chen, P., Song, L., Liu, Y., & Fang, Y. e. (2007). Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(7), 1165–1168. <https://doi.org/10.1016/J.RADPHYSICHEM.2006.11.012>
- Chookhongkha, N., Spondilok, T., & Photchanachai, S. (2013). Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and chilli seed quality. *Acta Horticulturae*, 973, 231–238. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2013.973.32>
- Cisternas, C., Tortella, G., Seabra, A. B., Pieretti, J. C., Araya-Castro, K., Hermosilla, E., Cristina Diez, M., & Rubilar, O. (2021). Development of a new biomimetic method for the synthesis of silver nanoparticles based on fungal metabolites: optimization and antibacterial activity. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(7), 1981–1990. <https://doi.org/10.1002/JCTB.6724>

Bibliografía

- Dalençon, F., Amjaud, Y., Lafforgue, C., Derouin, F., & Fessi, H. (1997). Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, *153*(1), 127–130. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00076-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00076-8)
- Dananjaya, S. H. S., Erandani, W. K. C. U., Kim, C. H., Nikapitiya, C., Lee, J., & De Zoysa, M. (2017). Comparative study on antifungal activities of chitosan nanoparticles and chitosan silver nano composites against *Fusarium oxysporum* species complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 478–488. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.07.056>
- Darwesh, O. M., Ali, S. S., Matter, I. A., Elsamahy, T., & Mahmoud, Y. A. (2020). Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications. *Methods in Enzymology*, *630*, 481–502. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2019.11.006>
- 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>
- De Vega, D., Holden, N., Hedley, P. E., Morris, J., Luna, E., & Newton, A. (2021). Chitosan primes plant defence mechanisms against *Botrytis cinerea*, including expression of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes. *Plant, Cell & Environment*, *44*(1), 290. <https://doi.org/10.1111/PCE.13921>
- Demirer, G. S., Zhang, H., Matos, J. L., Goh, N. S., Cunningham, F. J., Sung, Y., Chang, R., Aditham, A. J., Chio, L., Cho, M. J., Staskawicz, B., & Landry, M. P. (2019). High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nature Nanotechnology* *2019 14:5*, *14*(5), 456–464. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0382-5>
- Di Rienzo, J. A., Guzmán, 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/METRICS>
- Díaz Acosta, E. M., & Díaz Acosta, E. M. (2019). Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 12(22), 0–0.
<https://doi.org/10.22201/CEIICH.24485691E.2019.22.60758>
- Divya, K., Vijayan, S., Nair, S. J., & Jisha, M. S. (2019). Optimization of chitosan nanoparticle synthesis and its potential application as germination elicitor of *Oryza sativa* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 1053–1059.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.11.185>
- Durán, N., Cuevas, R., Cordi, L., Rubilar, O., & Diez, M. C. (2014). Biogenic silver nanoparticles associated with silver chloride nanoparticles (Ag@AgCl) produced by laccase from *Trametes versicolor*. *SpringerPlus*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-645/SCHEMES/1>
- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., De Souza, G. I. H., & Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-8/FIGURES/9>
- El-Gazzar, N., & Ismail, A. M. (2020). The potential use of Titanium, Silver and Selenium nanoparticles in controlling leaf blight of tomato caused by *Alternaria alternata*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101708.
<https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101708>
- Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., & Alborés, S. (2020). Biofilm Eradication Using Biogenic Silver Nanoparticles. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 2023, 25(9), 2023.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25092023>
- Fan, Z., Qin, Y., Liu, S., Xing, R., Yu, H., Chen, X., Li, K., & Li, P. (2018). Synthesis, characterization, and antifungal evaluation of diethoxyphosphoryl polyaminoethyl

Bibliografía

- chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 190, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.02.056>
- Farooq, M. A., Hannan, F., Islam, F., Ayyaz, A., Zhang, N., Chen, W., Zhang, K., Huang, Q., Xu, L., & Zhou, W. (2022). The potential of nanomaterials for sustainable modern agriculture: present findings and future perspectives. *Environmental Science: Nano*, 9(6), 1926–1951. <https://doi.org/10.1039/D1EN01124C>
- Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., & Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2009.04.006>
- Galeano, P., Galván, G. A., & Franco Fraguas, L. (2017). *Quitosano induce resistencia en el patosistema Allium cepa - Botrytis squamosa por aumento de la actividad quitinasa.*
- Gao, Y., & Wu, Y. (2022). Recent advances of chitosan-based nanoparticles for biomedical and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 203, 379–388. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.01.162>
- Garibaldi, L. A., Pérez-Méndez, N., Garratt, M. P. D., Gemmill-Herren, B., Miguez, F. E., & Dicks, L. V. (2019). Policies for Ecological Intensification of Crop Production. *Trends in Ecology and Evolution*, 34(4), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.01.003>
- Ghazy, N. A., Abd El-Hafez, O. A., El-Bakery, A. M., & El-Geddawy, D. I. H. (2021). Impact of silver nanoparticles and two biological treatments to control soft rot disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S41938-020-00347-5/TABLES/4>
- Giraldo, J. P., Wu, H., Newkirk, G. M., & Kruss, S. (2019). Nanobiotechnology approaches for engineering smart plant sensors. *Nature Nanotechnology* 2019 14:6, 14(6), 541–553. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0470-6>

- 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), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12951-021-00797-5/FIGURES/10>
- Gutiérrez, S. A., Cúndom, ;, María A, & Nea, C. (2021). ENFERMEDADES DEL TALLO Y VAINA FOLIAR DEL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*) EN ARGENTINA- Minireview. *Boletín de La Asociación Argentina de Fitopatólogos*, 9. <http://aafitopatologos.com.ar>
- Hamers, R. J. (2017). Nanomaterials and global sustainability. *Accounts of Chemical Research*, 50(3), 633–637. https://doi.org/10.1021/ACS.ACCOUNTS.6B00634/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AR-2016-00634M_0004.GIF
- Hermosilla, E., Díaz, M., Vera, J., Contreras, M. J., Leal, K., Salazar, R., Barrientos, L., Tortella, G., & Rubilar, O. (2023). Synthesis of Antimicrobial Chitosan-Silver Nanoparticles Mediated by Reusable Chitosan Fungal Beads. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 2318*, 24(3), 2318. <https://doi.org/10.3390/IJMS24032318>
- Hernández-Díaz, J. A., Garza-García, J. J. O., Zamudio-Ojeda, A., León-Morales, J. M., López-Velázquez, J. C., & García-Morales, S. (2021). Plant-mediated synthesis of nanoparticles and their antimicrobial activity against phytopathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(4), 1270–1287. <https://doi.org/10.1002/JSFA.10767>
- Hietzschold, S., Walter, A., Davis, C., Taylor, A. A., & Sepunaru, L. (2019). Does Nitrate Reductase Play a Role in Silver Nanoparticle Synthesis? Evidence for NADPH as the Sole Reducing Agent. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(9), 8070–8076. https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B00506/SUPPL_FILE/SC9B00506_SI_001.PDF
- Hu, D., Yu, S., Yu, D., Liu, N., Tang, Y., Fan, Y., Wang, C., & Wu, A. (2019). Biogenic *Trichoderma harzianum*-derived selenium nanoparticles with control functionalities originating from

Bibliografía

- diverse recognition metabolites against phytopathogens and mycotoxins. *Food Control*, 106, 106748. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106748>
- Huguet-Casquero, A., Gainza, E., & Pedraz, J. L. (2021). Towards Green Nanoscience: From extraction to nanoformulation. *Biotechnology Advances*, 46, 107657. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107657>
- Hyatt-Twynam, S. R., Parnell, S., Stutt, R. O. J. H., Gottwald, T. R., Gilligan, C. A., & Cunniffe, N. J. (2017). Risk-based management of invading plant disease. *New Phytologist*, 214(3), 1317–1329. <https://doi.org/10.1111/NPH.14488>
- Ibrahim, E., Fouad, H., Zhang, M., Zhang, Y., Qiu, W., Yan, C., Li, B., Mo, J., & Chen, J. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic bacteria and their role in inhibition of rice pathogenic bacteria and plant growth promotion. *RSC Advances*, 9(50), 29293–29299. <https://doi.org/10.1039/C9RA04246F>
- Ibrahim, E., Zhang, M., Zhang, Y., Hossain, A., Qiu, W., Chen, Y., Wang, Y., Wu, W., Sun, G., & Li, B. (2020). Green-Synthesization of Silver Nanoparticles Using Endophytic Bacteria Isolated from Garlic and Its Antifungal Activity against Wheat Fusarium Head Blight Pathogen Fusarium graminearum. *Nanomaterials 2020, Vol. 10, Page 219, 10(2)*, 219. <https://doi.org/10.3390/NANO10020219>
- Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012a). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
- Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012b). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
- INIA La Estanzuela. (2014). *Guía para el manejo de la FUSARIOSIS DE LA ESPIGA EN TRIGO*.
- Ioannou, A., Gohari, G., Papaphilippou, P., Panahirad, S., Akbari, A., Dadpour, M. R., Krasia-Christoforou, T., & Fotopoulos, V. (2020). Advanced nanomaterials in agriculture under

- a changing climate: The way to the future? *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104048. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2020.104048>
- Irshad, M. A., Nawaz, R., Zia ur Rehman, M., Imran, M., Ahmad, J., Ahmad, S., Inam, A., Razzaq, A., Rizwan, M., & Ali, S. (2020). Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles by chemical and green methods and their antifungal activities against wheat rust. *Chemosphere*, 258, 127352. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127352>
- Ivić, D., Sever, Z., & Kuzmanovska, B. (2011). In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. *Pesticidi i Fitomedicina*, 26(1), 35–42. <https://doi.org/10.2298/PIF1101035I>
- Jampafuang, Y., Tongta, A., & Waiprib, Y. (2019). Impact of Crystalline Structural Differences Between α - and β -Chitosan on Their Nanoparticle Formation Via Ionic Gelation and Superoxide Radical Scavenging Activities. *Polymers 2019, Vol. 11, Page 2010, 11(12)*, 2010. <https://doi.org/10.3390/POLYM11122010>
- Jo, Y. K., Kim, B. H., & Jung, G. (2009). Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *https://Doi.Org/10.1094/PDIS-93-10-1037*, 93(10), 1037–1043. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1037>
- Joshi, S. M., De Britto, S., & Jogaiah, S. (2021). Myco-engineered selenium nanoparticles elicit resistance against tomato late blight disease by regulating differential expression of cellular, biochemical and defense responsive genes. *Journal of Biotechnology*, 325, 196–206. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2020.10.023>
- Juraschek, L. M., Kappenberg, A., & Amelung, W. (2022). Mycotoxins in soil and environment. *Science of The Total Environment*, 814, 152425. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152425>
- Jyoti, K., Baunthiyal, M., & Singh, A. (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics.

- Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(3), 217–227.
<https://doi.org/10.1016/J.JRRAS.2015.10.002>
- Kafle, K., Poudel, A., Manandhar, S., & Adhikari, N. (2021). Efficacy of different fungicides against the in-vitro growth of *Pyricularia oryzae* causing Rice blast disease. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 6(3), 153–157.
<https://doi.org/10.22161/ijeab>
- Kasana, R. C., Panwar, N. R., Kaul, R. K., & Kumar, P. (2017). Biosynthesis and effects of copper nanoparticles on plants. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 233–240.
<https://doi.org/10.1007/S10311-017-0615-5/METRICS>
- Kaur, A., Kaur, A., Kalia, A., & Singh, N. (2016). Effect of media composition on extent of antimycotic activity of silver nanoparticles against plant pathogenic fungus *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease Research*, 31(1), 1–5.
- Kaur, P., Thakur, R., & Choudhary, A. (2012). An In Vitro Study of The Antifungal Activity of Silver/Chitosan Nanoformulations Against Important Seed Borne Pathogens. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC & TECHNOLOGY RESEARCH*, 1(6).
www.ijstr.org
- Kaur, P., Thakur, R., Duhan, J. S., & Chaudhury, A. (2018). Management of wilt disease of chickpea in vivo by silver nanoparticles biosynthesized by rhizospheric microflora of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(11), 3233–3243. <https://doi.org/10.1002/JCTB.5680>
- Khan, M. N., Li, Y., Khan, Z., Chen, L., Liu, J., Hu, J., Wu, H., & Li, Z. (2021). Nanoceria seed priming enhanced salt tolerance in rapeseed through modulating ROS homeostasis and α -amylase activities. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1186/S12951-021-01026-9/FIGURES/7>
- Kheiri, A., Moosawi Jorf, S. A., Mallhipour, A., Saremi, H., & Nikkhah, M. (2016). Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of *Fusarium* head blight of wheat

- (*Fusarium graminearum*) in vitro and greenhouse. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1261–1272. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.09.072>
- Koduru, J. R., Kailasa, S. K., Bhamore, J. R., Kim, K. H., Dutta, T., & Vellingiri, K. (2018). Phytochemical-assisted synthetic approaches for silver nanoparticles antimicrobial applications: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 256, 326–339. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2018.03.001>
- Kora, A. J., Mounika, J., & Jagadeeshwar, R. (2020). Rice leaf extract synthesized silver nanoparticles: An in vitro fungicidal evaluation against *Rhizoctonia solani*, the causative agent of sheath blight disease in rice. *Fungal Biology*, 124(7), 671–681. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2020.03.012>
- 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>
- Kulikouskaya, V., Hileuskaya, K., Kraskouski, A., Kozerozhets, I., Stepanova, E., Kuzminski, I., You, L., & Agabekov, V. (2022). Chitosan-capped silver nanoparticles: A comprehensive study of polymer molecular weight effect on the reaction kinetic, physicochemical properties, and synergetic antibacterial potential. *SPE Polymers*, 3(2), 77–90. <https://doi.org/10.1002/PLS2.10069>
- Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A. A., & Kim, K. H. (2019). Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, 294, 131–153. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2018.12.012>
- Kyoung, S. K., Min, J. Y., & Dickman, M. B. (2008). Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-5-0605>, 21(5), 605–612. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-5-0605>

- Lakshmeesha, T. R., Murali, M., Ansari, M. A., Udayashankar, A. C., Alzohairy, M. A., Almatroudi, A., Alomary, M. N., Asiri, S. M. M., Ashwini, B. S., Kalagatur, N. K., Nayak, C. S., & Niranjana, S. R. (2020). Biofabrication of zinc oxide nanoparticles from *Melia azedarach* and its potential in controlling soybean seed-borne phytopathogenic fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(8), 1923–1930. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.06.013>
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology* 2013 11:6, 11(6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
- Li, H., Huang, J., Lu, F., Liu, Y., Song, Y., Sun, Y., Zhong, J., Huang, H., Wang, Y., Li, S., Lifshitz, Y., Lee, S. T., & Kang, Z. (2018). Impacts of carbon dots on rice plants: Boosting the growth and improving the disease resistance. *ACS Applied Bio Materials*, 1(3), 663–672. https://doi.org/10.1021/ACSABM.8B00345/ASSET/IMAGES/LARGE/MT-2018-00345W_0006.JPEG
- Li, X., Odoom-Wubah, T., & Huang, J. (2018). Biosynthesis of Ag-Pd bimetallic alloy nanoparticles through hydrolysis of cellulose triggered by silver sulfate. *RSC Advances*, 8(53), 30340–30345. <https://doi.org/10.1039/C8RA04301A>
- Liu, Y., Xiao, Z., Chen, F., Yue, L., Zou, H., Lyu, J., & Wang, Z. (2021). Metallic oxide nanomaterials act as antioxidant nanozymes in higher plants: Trends, meta-analysis, and prospect. *Science of The Total Environment*, 780, 146578. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146578>
- M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition.* (2015). www.clsi.org.
- Mahapatra, D. M., Satapathy, K. C., & Panda, B. (2022). Biofertilizers and nanofertilizers for sustainable agriculture: Phycoprosects and challenges. *Science of The Total Environment*, 803, 149990. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149990>

- Majumdar, S., & Keller, A. A. (2021). Omics to address the opportunities and challenges of nanotechnology in agriculture. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(22), 2595–2636. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1785264>
- Mathew, T. V., & Kuriakose, S. (2013). Photochemical and antimicrobial properties of silver nanoparticle-encapsulated chitosan functionalized with photoactive groups. *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 4409–4415. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2013.06.037>
- Medda, S., Hajra, A., Dey, U., Bose, P., & Mondal, N. K. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against Rhizopus sp. and Aspergillus sp. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 5(7), 875–880. <https://doi.org/10.1007/S13204-014-0387-1/FIGURES/7>
- 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0097881>
- Mo, S., Shao, X., Chen, Y., & Cheng, Z. (2016). Increasing entropy for colloidal stabilization. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep36836>
- Mohamed, N., & Madian, N. G. (2020). Evaluation of the mechanical, physical and antimicrobial properties of chitosan thin films doped with greenly synthesized silver nanoparticles. *Materials Today Communications*, 25, 101372. <https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2020.101372>
- Mondéjar-López, M., López-Jimenez, A. J., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., & Niza, E. (2023). Chitosan coated - biogenic silver nanoparticles from wheat residues as green antifungal and nanoprimer in wheat seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 964–973. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.11.159>
- Mondéjar-López, M., López-Jimenez, A. J., García Martínez, J. C., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., & Niza, E. (2022). Comparative evaluation of carvacrol and eugenol chitosan

- nanoparticles as eco-friendly preservative agents in cosmetics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 288–297.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.02.164>
- Mostafa, Y. S., Alamri, S. A., Alrumman, S. A., Hashem, M., & Baka, Z. A. (2021). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Pomegranate and Orange Peel Extracts and Their Antifungal Activity against *Alternaria solani*, the Causal Agent of Early Blight Disease of Tomato. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 2363, 10(11), 2363.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS10112363>
- Mukherjee, A., Majumdar, S., Servin, A. D., Pagano, L., Dhankher, O. P., & White, J. C. (2016). Carbon nanomaterials in agriculture: A critical review. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 168246. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00172/BIBTEX>
- Mulvaney, P. (1996). Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir*, 12(3), 788–800. <https://doi.org/10.1021/LA9502711>
- Mussin, J. E. (2017). *Nanopartículas de plata y su potencial antifúngico*. <http://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/handle/123456789/52572>
- Muthukrishnan, S., Murugan, I., & Selvaraj, M. (2019). Chitosan nanoparticles loaded with thiamine stimulate growth and enhances protection against wilt disease in Chickpea. *Carbohydrate Polymers*, 212, 169–177.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.02.037>
- Nanehkaran, Y. A., Zhang, D., Chen, J., Tian, Y., & Al-Nabhan, N. (2020). Recognition of plant leaf diseases based on computer vision. *Journal of Ambient Intelligence and Humanized Computing*, 1–18. <https://doi.org/10.1007/S12652-020-02505-X/METRICS>
- Nasaruddin, R. R., Chen, T., Yao, Q., Zang, S., & Xie, J. (2021). Toward greener synthesis of gold nanomaterials: From biological to biomimetic synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, 426, 213540. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2020.213540>
- Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Kaushik, A., Sonne, C., Kim, K. H., & Kumar, S. (2021). Emerging nanobiotechnology in agriculture for the management of pesticide residues.

Bibliografía

- Journal of Hazardous Materials*, 401, 123369.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.123369>
- Nejad, M. S., Bonjar, G. H. S., Khatami, M., Amini, A., & Aghighi, S. (2017). In vitro and in vivo antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a common agent of rice sheath blight disease. *IET Nanobiotechnology*, 11(3), 236–240.
<https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2015.0121>
- Nguyen Van, S., Dinh Minh, H., & Nguyen Anh, D. (2013). Original Research Paper. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 289–294.
<https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2013.06.001>
- Noman, M., Ahmed, T., Shahid, M., Niazi, M. B. K., Qasim, M., Kouadri, F., Abdulmajeed, A. M., Alghanem, S. M., Ahmad, N., Zafar, M., & Ali, S. (2021). Biogenic copper nanoparticles produced by using the *Klebsiella pneumoniae* strain NST2 curtailed salt stress effects in maize by modulating the cellular oxidative repair mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 217, 112264.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112264>
- Obeso–Estrella, R., Pawelec, B., Mota, N., Flores–Sanchez, L. A., Quintana–Melgoza, J. M., Yocupicio–Gaxiola, R. I., & Zepeda, T. A. (2022). Method for analyzing HR-TEM micrographs to propose and/or describe structures and their interaction in crystalline materials. *MethodsX*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101855>
- Okey-Onyesolu, C. F., Hassanisaadi, M., Bilal, M., Barani, M., Rahdar, A., Iqbal, J., & Kyzas, G. Z. (2021). Nanomaterials as Nanofertilizers and Nanopesticides: An Overview. *ChemistrySelect*, 6(33), 8645–8663. <https://doi.org/10.1002/SLCT.202102379>
- Omran, B. A. (2020a). Fundamentals of Nanotechnology and Nanobiotechnology. *Nanotechnology in the Life Sciences*, 1–36. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46071-6_1/COVER

- Omran, B. A. (2020b). Inspired Biological Synthesis of Nanomaterials Using Eukaryotic Microbial Nano-Machinery. *Nanotechnology in the Life Sciences*, 81–109. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46071-6_3/COVER
- Omran, B. A. (2020c). Prokaryotic Microbial Synthesis of Nanomaterials (The World of Unseen). *Nanotechnology in the Life Sciences*, 37–79. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46071-6_2/COVER
- Omran, B. A. (2022). Biogenic nanomaterials: Synthesis, characteristics, and recent trends in combating hazardous pollutants (An arising scientific horizon). *Development in Wastewater Treatment Research and Processes: Removal of Emerging Contaminants from Wastewater through Bio-Nanotechnology*, 199–246. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85583-9.00006-5>
- Omran, B. A., & Baek, K. H. (2022). Control of phytopathogens using sustainable biogenic nanomaterials: Recent perspectives, ecological safety, and challenging gaps. *Journal of Cleaner Production*, 372, 133729. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.133729>
- Omran, B. A., Whitehead, K. A., & Baek, K. H. (2021). One-pot bioinspired synthesis of fluorescent metal chalcogenide and carbon quantum dots: Applications and potential biotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 200, 111578. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2021.111578>
- Palithya, S., Gaddam, S. A., Kotakadi, V. S., Penchalaneni, J., & Challagundla, V. N. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Decaschistia crotonifolia* and its antibacterial, antioxidant, and catalytic applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 14(1), 136–151. <https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1876172>
- Pandiarajan, J., Balaji, S., Revathy, K., & Palanikumar, S. (2018). Fabrication and validation of silver nanoparticles from cocoon extract of silk worm *Bombyx mori*. *L. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 692–705. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.05.017>
- Parmar, A., Kaur, G., Kapil, S., Sharma, V., Choudhary, M. K., & Sharma, S. (2019). Novel biogenic silver nanoparticles as invigorated catalytic and antibacterial tool: A cleaner

- approach towards environmental remediation and combating bacterial invasion. *Materials Chemistry and Physics*, 238, 121861. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2019.121861>
- Patil, M. P., Singh, R. D., Koli, P. B., Patil, K. T., Jagdale, B. S., Tipare, A. R., & Kim, G. Do. (2018). Antibacterial potential of silver nanoparticles synthesized using *Madhuca longifolia* flower extract as a green resource. *Microbial Pathogenesis*, 121, 184–189. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.05.040>
- Pawlicka, A., Danczuk, M., Wieczorek, W., & Zygadło-Monikowska, E. (2008). Influence of Plasticizer Type on the Properties of Polymer Electrolytes Based on Chitosan†. *Journal of Physical Chemistry A*, 112(38), 8888–8895. <https://doi.org/10.1021/JP801573H>
- Pereira, A. E. S., Sandoval-Herrera, I. E., Zavala-Betancourt, S. A., Oliveira, H. C., Ledezma-Pérez, A. S., Romero, J., & Fraceto, L. F. (2017). γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1862–1873. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.11.073>
- Pereira, A. E. S., Silva, P. M., Oliveira, J. L., Oliveira, H. C., & Fraceto, L. F. (2017). Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 141–152. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2016.11.027>
- Perveen, R., Shujaat, S., Qureshi, Z., Nawaz, S., Khan, M. I., & Iqbal, M. (2020). Green versus sol-gel synthesis of ZnO nanoparticles and antimicrobial activity evaluation against panel of pathogens. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(4), 7817–7827. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2020.05.004>
- Ponmurugan, P. (2017). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Trichoderma atroviride* for the biological control of Phomopsis canker disease in tea plants. *IET Nanobiotechnology*, 11(3), 261–267. <https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2016.0029>

Bibliografía

- Priya, K., Vijayakumar, M., & Janani, B. (2020). Chitosan-mediated synthesis of biogenic silver nanoparticles (AgNPs), nanoparticle characterisation and in vitro assessment of anticancer activity in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 844–852. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.007>
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693–2700. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2004.09.007>
- Rad, F., Mohsenifar, A., Tabatabaei, M., Safarnejad, M. R., Shahryari, F., H. Safarpour, Foroutan, A., Mardi, M., Davoudi, D., & Fotokian, M. (2012, November). *DETECTION OF CANDIDATUS PHYTOPLASMA AURANTIFOLIA WITH A QUANTUM DOTS FRET-BASED BIOSENSOR on JSTOR*. *Journal of Plant Pathology*. <https://www.jstor.org/stable/45156279>
- Rafique, M., Sadaf, I., Tahir, M. B., Rafique, M. S., Nabi, G., Iqbal, T., & Sughra, K. (2019). Novel and facile synthesis of silver nanoparticles using Albizia procera leaf extract for dye degradation and antibacterial applications. *Materials Science and Engineering: C*, 99, 1313–1324. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.02.059>
- Rai, M., Bonde, S., Golinska, P., Trzcińska-Wencel, J., Gade, A., Abd-Elsalam, K., Shende, S., Gaikwad, S., & Ingle, A. P. (2021). Fusarium as a Novel Fungus for the Synthesis of Nanoparticles: Mechanism and Applications. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 139, 7(2), 139. <https://doi.org/10.3390/JOF7020139>
- Rai-Kalal, P., Tomar, R. S., & Jajoo, A. (2021). H₂O₂ signaling regulates seed germination in ZnO nanoprimed wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds for improving plant performance under drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 189, 104561. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2021.104561>

- Rajwade, J. M., Chikte, R. G., & Paknikar, K. M. (2020). Nanomaterials: new weapons in a crusade against phytopathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1437–1461. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10334-Y/METRICS>
- Raza, S., Ansari, A., Siddiqui, N. N., Ibrahim, F., Abro, M. I., & Aman, A. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles for the fabrication of non cytotoxic and antibacterial metallic polymer based nanocomposite system. *Scientific Reports*, 11(1), 10500. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-90016-W>
- Rodríguez Hamamura, N., Valderrama Negrón, A., Alarcón Cavero, H., & López Milla, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 76(4), 336–354. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2010000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rodríguez-González, V., Terashima, C., & Fujishima, A. (2019). Applications of photocatalytic titanium dioxide-based nanomaterials in sustainable agriculture. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 40, 49–67. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEMREV.2019.06.001>
- Safarpour, H., Safarnejad, M. R., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., Rad, F., Basirat, M., Shahryari, F., & Hasanzadeh, F. (2012). Development of a quantum dots FRET-based biosensor for efficient detection of *Polymyxa betae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(4), 507–515. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.709885>
- Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S. S., & Pal, A. (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 677–683. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.10.012>
- Samimi, S., Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., & Dorkoosh, F. (2019). Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. *Characterization and Biology of Nanomaterials*

- for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, 47–76.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00003-9>
- Sanghi, R., & Verma, P. (2009). Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource Technology*, 100(1), 501–504.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.05.048>
- 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), 101–110.
<https://doi.org/10.22201/CEIICH.24485691E.2019.22.67627>
- Sanguiñedo, P., Faccio, R., Abreo, E., & Alborés, S. (2023). Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: Potential Antifungal Agents in Rice and Wheat Crops. *Chemistry (Switzerland)*, 5(4), 2104–2119. <https://doi.org/10.3390/CHEMISTRY5040143/S1>
- Sanguiñedo, P., Fratila, R. M., Estevez, M. B., de la Fuente, J. M., Grazú, V., & Alborés, S. (2018). Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi and Their Antibacterial Activity. *Nano Biomedicine and Engineering*, 10(2), 165–173.
<https://doi.org/10.5101/NBE.V10I2.P165-173>
- Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P. V. D., Ghosh, S. S., & Chattopadhyay, A. (2008). The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 142–146.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.03.004>
- Santana, I., Wu, H., Hu, P., & Giraldo, J. P. (2020). Targeted delivery of nanomaterials with chemical cargoes in plants enabled by a biorecognition motif. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15731-w>
- Sathiyabama, M., & Charles, R. E. (2015). Fungal cell wall polymer based nanoparticles in protection of tomato plants from wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp.

- lycopersici. *Carbohydrate Polymers*, 133, 400–407.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.07.066>
- Sathiyabama, M., Indhumathi, M., & Amutha, T. (2020). Preparation and characterization of curcumin functionalized copper nanoparticles and their application enhances disease resistance in chickpea against wilt pathogen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101823. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101823>
- Sathiyabama, M., & Parthasarathy, R. (2016). Biological preparation of chitosan nanoparticles and its in vitro antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. *Carbohydrate Polymers*, 151, 321–325.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.033>
- Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Mariadoss, A. V. A., & Wang, M. H. (2020). Biocompatible fungal chitosan encapsulated phytogenic silver nanoparticles enhanced antidiabetic, antioxidant and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 63–71. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.291>
- Selvamani, V. (2019). Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, 425–444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5>
- Senthilkumar, P., Yaswant, G., Kavitha, S., Chandramohan, E., Kowsalya, G., Vijay, R., Sudhagar, B., & Kumar, D. S. R. S. (2019). Preparation and characterization of hybrid chitosan-silver nanoparticles (Chi-Ag NPs); A potential antibacterial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 290–298.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.08.234>
- Shahid-ul-Islam, Butola, B. S., & Verma, D. (2019). Facile synthesis of chitosan-silver nanoparticles onto linen for antibacterial activity and free-radical scavenging textiles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 1134–1141.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.04.186>

- Shanthi, S., David Jayaseelan, B., Velusamy, P., Vijayakumar, S., Chih, C. T., & Vaseeharan, B. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 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>
- Sharma, A., Sood, K., Kaur, J., & Khatri, M. (2019). Agrochemical loaded biocompatible chitosan nanoparticles for insect pest management. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *18*, 101079. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.101079>
- Sharma, S., Sahu, B. K., Cao, L., Bindra, P., Kaur, K., Chandel, M., Koratkar, N., Huang, Q., & Shanmugam, V. (2021). Porous nanomaterials: Main vein of agricultural nanotechnology. *Progress in Materials Science*, *121*, 100812. <https://doi.org/10.1016/J.PMATSCI.2021.100812>
- Shinde, S., Folliero, V., Chianese, A., Zannella, C., De Filippis, A., Rosati, L., Prisco, M., Falanga, A., Mali, A., Galdiero, M., Galdiero, M., & Franci, G. (2021). Synthesis of Chitosan-Coated Silver Nanoparticle Bioconjugates and Their Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Bacteria. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 9340, 11(19), 9340. <https://doi.org/10.3390/APP11199340>
- Siddiqui, Z. A., Parveen, A., Ahmad, L., & Hashem, A. (2019). Effects of graphene oxide and zinc oxide nanoparticles on growth, chlorophyll, carotenoids, proline contents and diseases of carrot. *Scientia Horticulturae*, *249*, 374–382. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.01.054>
- Singh, A., Gaurav, S. S., Shukla, G., & Rani, P. (2022). Assessment of mycogenic zinc nanofungicides against pathogenic early blight (*Alternaria solani*) of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Materials Today: Proceedings*, *49*, 3528–3537. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.07.244>
- 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>
- Steentjes, M. B. F., Scholten, O. E., & van Kan, J. A. L. (2021). Peeling the onion: Towards a better understanding of botrytis diseases of onion. *Phytopathology*, 111(3), 464–473. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0258-IA/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-06-20-0258-IAF2.JPEG>
- Sullivan, D. J., Cruz-Romero, M., Collins, T., Cummins, E., Kerry, J. P., & Morris, M. A. (2018). Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 355–364. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.05.010>
- Tanović, B., Koščica, M., Hrustić, J., Mihajlović, M., Trkulja, V., & Delibašić, G. (2019). Botrytis squamosa - the causal agent of onion leaf blight in Bosnia and Herzegovina. *Pesticidi i Fitomedicina*, 34(1), 9–17. <https://doi.org/10.2298/PIF1901009T>
- Tasic, L., Durán, N., Fávoro, W. J., Alborés, S., & da Costa, T. S. (2023). Biogenic Silver Nanoparticles Capped with Proteins: Timed Knowledge and Perspectives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 34(7), 897–905. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230062>
- Tharani, S., Bharathi, D., & Ranjithkumar, R. (2020). Extracellular green synthesis of chitosan-silver nanoparticles using *Lactobacillus reuteri* for antibacterial applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101838. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101838>
- Tian, Y., Che, Z., Sun, D., He, J., Liu, S., & Lin, X. (2019). In Vitro Effects of Five Different Classes of Fungicides on Growth and Development of *Botrytis cinerea* Isolated from Tree Peony in China. *HortScience*, 54(11), 1984–1988. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14431-19>
- U Picoli, S., Durán, M., F Andrade, P., & Duran, N. (2016). Silver nanoparticles/silver chloride (Ag/AgCl) synthesized from *Fusarium oxysporum* acting against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and extended spectrum beta-lactamase (ESBL). *Frontiers in*

Nanoscience and Nanotechnology, 2(2), 107–110.
<https://doi.org/10.15761/FNN.1000117>

Vásquez, N., Elizalde, V., Castro, A., Miraballes, I., Pardo, H., & Alborés, S. (2023). Development and characterization of chitosan–silver nanohybrids with potential application in the control of fungal phytopathogens. *MRS Advances*, 1–5.
<https://doi.org/10.1557/S43580-023-00650-X/METRICS>

Vijayabharathi, R., Sathya, A., & Gopalakrishnan, S. (2018). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 and its antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of sorghum. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 166–171. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.03.006>

Vilamová, Z., Konvičková, Z., Mikeš, P., Holišová, V., Mančík, P., Dobročka, E., Kratošová, G., & Seidlerová, J. (2019). Ag-AgCl Nanoparticles Fixation on Electrospun PVA Fibres: Technological Concept and Progress. *Scientific Reports*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/S41598-019-51642-7>

Wang, A., Li, J., Al-Huqail, A. A., Al-Harbi, M. S., Ali, E. F., Wang, J., Ding, Z., Rekaby, S. A., Ghoneim, A. M., & Eissa, M. A. (2021). Mechanisms of Chitosan Nanoparticles in the Regulation of Cold Stress Resistance in Banana Plants. *Nanomaterials 2021, Vol. 11, Page 2670*, 11(10), 2670. <https://doi.org/10.3390/NANO11102670>

Wang, X., Liu, X., Chen, J., Han, H., & Yuan, Z. (2014). Evaluation and mechanism of antifungal effects of carbon nanomaterials in controlling plant fungal pathogen. *Carbon*, 68, 798–806. <https://doi.org/10.1016/J.CARBON.2013.11.072>

Williamson-Benavides, B. A., & Dhingra, A. (2021). Understanding Root Rot Disease in Agricultural Crops. *Horticulturae 2021, Vol. 7, Page 33*, 7(2), 33.
<https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7020033>

Winayu, I. J., Ekantari, N., Puspita, I. D., Ustadi, Budhijanto, W., & Nugraheni, P. S. (2019). The effect of reduced acetic acid concentration on nano-chitosan formulation as fish

- preservative. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 633(1), 012040. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/633/1/012040>
- Wingen, L. U., Shaw, M. W., & Brown, J. K. M. (2013). Long-distance dispersal and its influence on adaptation to host resistance in a heterogeneous landscape. *Plant Pathology*, 62(1), 9–20. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2012.02621.X>
- Wu, H., & Li, Z. (2022). Recent advances in nano-enabled agriculture for improving plant performance. *The Crop Journal*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.CJ.2021.06.002>
- Xu, L., Zhu, Z., & Sun, D. W. (2021). Bioinspired Nanomodification Strategies: Moving from Chemical-Based Agrosystems to Sustainable Agriculture. *ACS Nano*, 15(8), 12655–12686. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.1C03948/ASSET/IMAGES/LARGE/NN1C03948_0007.JPEG
- Yan, X., Dong, T., Yun, X., Tanaka, F., Tanaka, F., Wardana, A. A., & Meng, F. (2023). Improving ‘Nanguo’ pear fungal disease and storability by chitosan coating combined with diepoxy-poly (ethylene glycol). *Food Bioscience*, 53, 102842. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102842>
- Yi, Y., Wang, C., Cheng, X., Yi, K., Huang, W., & Yu, H. (2021). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Conyza canadensis* and Their Antifungal Activity against *Bipolaris maydis*. *Crystals* 2021, Vol. 11, Page 1443, 11(12), 1443. <https://doi.org/10.3390/CRYST11121443>
- Yugay, Y., Rusapetova, T., Mashtalyar, D., Grigorchuk, V., Vasyutkina, E., Kudinova, O., Zenkina, K., Trifuntova, I., Karabtsov, A., Ivanov, V., Aseeva, T., Bulgakov, V., & Shkryl, Y. (2021). Biomimetic synthesis of functional silver nanoparticles using hairy roots of *Panax ginseng* for wheat pathogenic fungi treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 207, 112031. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2021.112031>
- Zhan, J., Thrall, P. H., Papaix, J., Xie, L., & Burdon, J. J. (2015). Playing on a Pathogen’s Weakness: Using Evolution to Guide Sustainable Plant Disease Control Strategies.

Bibliografía

<https://doi.org/10.1146/Annurev-Phyto-080614-120040>, 53, 19–43.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-080614-120040>

Zhang, N., Yuan, S., Zhao, C., Park, R. F., Wen, X., Yang, W., Zhang, N., & Liu, D. (2021). TaNAC35 acts as a negative regulator for leaf rust resistance in a compatible interaction between common wheat and *Puccinia triticina*. *Molecular Genetics and Genomics*, 296(2), 279–287. <https://doi.org/10.1007/S00438-020-01746-X/METRICS>

Zhou, B., & Li, X. (2021). The monitoring of chemical pesticides pollution on ecological environment by GIS. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101506. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.101506>

Zimet, P., Mombrú, Á. W., Faccio, R., Brugnini, G., Miraballes, I., Rufo, C., & Pardo, H. (2018). Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. *LWT*, 91, 107–116. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.01.015>

Zimet, P., Mombrú, Á. W., Mombrú, D., Castro, A., Villanueva, J. P., Pardo, H., & Rufo, C. (2019). Physico-chemical and antilisterial properties of nisin-incorporated chitosan/carboxymethyl chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 219, 334–343. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.05.013>

Zohra, E., Ikram, M., Omar, A. A., Hussain, M., Satti, S. H., Raja, N. I., Mashwani, Z. U. R., & Ehsan, M. (2021). Potential applications of biogenic selenium nanoparticles in alleviating biotic and abiotic stresses in plants: A comprehensive insight on the mechanistic approach and future perspectives. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 456–475. https://doi.org/10.1515/GPS-2021-0047/ASSET/GRAPHIC/J_GPS-2021-0047_FIG_002.JPG

ANEXOS

Composición de medios empleados

(Fórmula aproximada por litro, en agua destilada)

Mueller Hinton Broth (HIMEDIA®)

Infusión de carne	300 g
Hidrolizado de ácido de caseína	17.50 g
Almidón	1.50 g
pH 7.4 ± 0.2 a 25°C	

Potato Dextrose Agar (OXOID®)

Extracto de papa	4.0 g
Glucosa	20.0 g
Agar	15.0 g
pH 5.6 ± 0.2 a 25°C	

Potato Dextrose Broth (Sigma-Aldrich®)

Extracto de papa	4.0 g
Glucosa	20.0 g
pH 5.6 ± 0.2 a 25°C	

DOI

<https://doi.org/10.1557/s43580-023-00650-x>

Home > MRS Advances > Article

Development and characterization of chitosan–silver nanohybrids with potential application in the control of fungal phytopathogens

Original Paper | Published: 04 October 2023
(2023) [Cite this article](#)

Noheilly Vásquez, Valeria Elizalde, Analía Castro, Iris Miraballes, Helena Pardo  & Silvana Alborés 

Abstract

In the agricultural field, chitosan (CS) is of great interest due to their broad antimicrobial activity and their ability to induce resistance mechanisms in plants against phytopathogens. Likewise, the potential of silver nanoparticles in preventing microbial infections has been demonstrated, including their broad antimicrobial activity against phytopathogens. In this study, the synthesis and characterization of chitosan–silver nanohybrids were performed. Firstly, mycosynthesis of biogenic silver nanoparticles (PchNPs) was carried out. Subsequently, the nanohybrid (CS–PchNHs) synthesis involved the addition of PchNPs, with continuous stirring, into a CS solution. For the first time, stable CS–Pch NHs were produced using biogenic silver nanoparticles from the fungus *Phanerochaete chrysosporium*, characterized by UV–visible spectroscopy (UV–Vis), Dynamic Light Scattering, (DLS), ζ -Potential, and X- ray diffraction (XRD). Additionally, CS–PchNHs exhibited high antifungal activity at low concentrations against four phytopathogens, suggesting that these nanosystems may be used as an alternative to the current hazardous antifungal agents in the integrated disease management.

Graphical abstract

