

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de nanohíbridos para aplicaciones en el sector agrícola

Código de proyecto ANII: FMV_1_2021_1_167206

Fecha de cierre de proyecto: 01/01/2025

ALBORÉS MALÁN, Silvana Victoria (Responsable Técnico - Científico)

VASQUEZ RODRÍGUEZ, Noheilly (Investigador)

ARRARTE OLIVERA, Eloísa Carolina (Investigador)

CARDOSO GONZÁLEZ, Mauricio Sebastian (Investigador)

ELIZALDE BENÍTEZ, Valeria (Investigador)

ESTEVEZ, María Belén (Investigador)

FACCIO SGIOROVELLO, Ricardo Juan (Investigador)

FRANCO FRAGUAS RUSSO, María Laura (Investigador)

GALEANO GIMENEZ, Pablo (Investigador)

GALVÁN VIVERO, Guillermo Alesio (Investigador)

PARDO MINETTI, Helena (Investigador)

RAFFAELLI BERTOLOTTI, María Sofia (Investigador)

SANGUIÑEDO DE BELLIS, Paula (Investigador)

ZIMET GELBTRUNK, Patricia (Investigador)

ABREO GIMENEZ, Eduardo Raul (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA \\
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Los problemas ambientales causados por polímeros sintéticos han impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles, como los biopolímeros basados en quitosano. El quitosano tiene propiedades antimicrobianas y puede inducir respuestas de resistencia en plantas frente a patógenos. Además, las nanopartículas de plata presentan un gran potencial para el control de fitopatógenos.

Con la experiencia del grupo en el trabajo con hongos y quitosano, se propuso producir quitosano fúngico a partir del micelio a partir del micelio de *Rhizopus stolonifer*, generado en el proceso de síntesis de nanopartículas de plata, logrando un rendimiento superior a lo reportado previamente.

Por otro lado, se sintetizaron y caracterizaron nanohíbridos de plata-quitosano, cuya actividad antifúngica in vitro fue mayor que la de los componentes por separado, lo que sugiere una aplicación prometedora en el control de microorganismos en la agricultura. Se evaluaron tratamientos de semillas de trigo y arroz con los nanosistemas, sin afectar la germinación.

También se investigó el control del fitopatógeno *Botrytis squamosa* en cebolla, observando una reducción de síntomas y mayor actividad de enzimas de defensa en las plantas tratadas.

Estos resultados, que muestran el potencial de la nanobiotecnología en el manejo de enfermedades vegetales, fueron presentados en la Jornada Interdisciplinaria "Nanotecnología Aplicada en la Agricultura: ejemplos, avances y desafíos", organizada en el marco del proyecto en Facultad de Química, con la participación de investigadores, estudiantes y actores del sector productivo de distintas instituciones y empresas interesadas en la temática.

Algunos de los resultados obtenidos fueron presentados en eventos de las distintas disciplinas, y publicados en dos manuscritos en revistas científicas arbitradas y en una tesis de Maestría en Biotecnología, realizada con la beca asociada al proyecto.

Asimismo, este proyecto contribuyó en la formación interdisciplinaria de recursos humanos, tanto de posgrado y grado, como de jóvenes investigadores en etapas de consolidación.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Biotecnología

Palabras clave: nanopartículas de plata - quitosano / antimicrobianos / fitopatógenos /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Importancia del quitosano en el área agrícola

El quitosano ha tenido aplicaciones en diversas áreas incluyendo la biotecnología, biomedicina, agroalimentaria, agricultura, otorgando una ventaja competitiva al integrar una tecnología sostenible y ecológica. En particular la incorporación de compuestos antimicrobianos en películas de quitosano permite mejorar la seguridad y la vida útil de los alimentos, o extender la vida poscosecha de la fruta. También se ha reportado que el quitosano combinado con un agente de control biológico puede producir un efecto sinérgico en el control de fitopatógenos de madera.

Además, el quitosano tiene gran utilidad en el recubrimiento de semillas para mejorar la apariencia de las semillas y las características de manipulación que faciliten la siembra (peso, tamaño) y /o liberar compuestos activos que pueden proteger las semillas contra fitopatógenos durante la germinación y que promueven el crecimiento de las plantas. Hoy en día, el recubrimiento de semillas es utilizado por industrias hortícolas y agrícolas en todo el mundo y ha ganado su lugar en el mercado global. Es usado para aplicar colorantes, pesticidas, compuestos que estimulan la germinación, crecimiento y resistencia al estrés, para la inoculación con microorganismos benéficos para la planta o controladores de enfermedades, etc. En particular, el quitosano puede ser utilizado como sustrato para aumentar volumen y portador de microorganismos benéficos en recubrimientos de semillas.

En los últimos años la producción de quitosano a partir de fuentes fúngicas ha ganado atención por las ventajas que presenta respecto a las fuentes convencionales, por obtener mejor homogeneidad en la longitud de las cadenas poliméricas, mayores grados de desacetilación y solubilidades y reducción del potencial de alergenicidad. Es por eso que, en base a la experiencia previa del grupo tanto en el trabajo con hongos como en la síntesis y caracterización de nanopartículas y películas basadas en quitosano, uno de los propósitos del proyecto fue producir quitosano fúngico a partir del micelio generado en el proceso de síntesis de nanopartículas. En caso de obtenerse buen rendimiento y calidad, el quitosano fúngico podría ser utilizado en el desarrollo de sistemas aplicables en inocuidad alimentaria y sanidad vegetal.

Las nanopartículas como antimicrobianos

Las nanopartículas basadas en quitosano son utilizadas para diversas aplicaciones por su biodegradabilidad, alta permeabilidad a las membranas biológicas, no tóxicas para los seres humanos, y amplias actividades antimicrobianas. En particular en el área agrícola es de gran interés su amplia actividad antimicrobiana y su capacidad de inducir mecanismos de resistencia en plantas frente a fitopatógeno, 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. Como insumo de origen natural, el quitosano es una alternativa sustentable y ecológica frente al uso de agroquímicos de síntesis para el control de enfermedades en plantas.

La alta relación de área superficial/volumen de los sistemas nanoparticulados resulta en una mucho mayor reactividad superficial permitiéndoles ser más eficaces como antimicrobianos que sus equivalentes de mayor escala. La aplicación de las nanopartículas de plata (AgNPs) se ha expandido en el área de la salud humana y animal, agrícola y de materiales, demostrando su potencial utilidad en la prevención de infecciones microbianas. Además, se ha demostrado que el agente estabilizante presente en las AgNPs de síntesis biológica les confiere mayor actividad antimicrobiana, menor citotoxicidad y genotoxicidad. Algunas AgNPs sintetizadas por hongos, como las previamente sintetizadas por nuestro grupo, presentaron amplia actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas, gram positivas y hongos patógenos de plantas. Además, hemos demostrado la efectividad de estas nanopartículas en la erradicación de biofilms microbianos. El potencial antimicrobiano de las AgNPs es muy promisorio en el control de fitopatógenos con alto impacto en la agricultura. Por lo tanto, combinar ambos tipos de nanopartículas se presenta como una interesante alternativa con la que se espera que las propiedades de ambos sistemas (de quitosano y de plata) contribuyan de forma sinérgica, como ha sido reportado previamente, conformando nuevos nanomateriales híbridos. Además, es importante conocer las características de los nanomateriales, ya que de sus propiedades (tamaño, forma, carga, composición, eficiencia de incorporación de quitosano en los nanohíbridos, etc.), dependerá su actividad antimicrobiana. Por ello todos los nanomateriales desarrollados en este proyecto fueron caracterizados mediante técnicas complementarias.

Alternativas para el cuidado del medio ambiente

La búsqueda de alternativas al control químico en el manejo de enfermedades de los cultivos constituye un tema relevante por las consecuencias ambientales que conlleva el uso de pesticidas. A la búsqueda de fuentes de resistencia en la base genética de los cultivos, se suman estrategias de manejo y control que impliquen el uso de insumos de origen natural. La inducción de resistencia en plantas mediante aplicaciones exógenas de sustancias naturales constituye un abordaje ecológicamente amigable para el control de enfermedades que afectan a los cultivos ya que no implica el uso de sustancias biocidas. Se inducen cambios en las plantas, de forma que su capacidad de defensa se ve aumentada, activando proteínas vinculadas a la patogénesis. Los inductores de resistencia están asociados a las defensas activadas del ácido salicílico como a las del ácido jasmónico, engrosamiento de la pared celular, entre otros efectos. Distintos compuestos químicos actúan como inductores de resistencia, entre ellos el quitosano. Es así que, en el presente proyecto, se buscó un impacto en el cuidado del medio ambiente, generando materiales de síntesis biológica que reemplacen a los de síntesis química utilizados actualmente, mediante el aprovechamiento de recursos naturales que disponemos en nuestro país y contribuyendo al manejo integrado de enfermedades de los cultivos.

Antecedentes del grupo

Los integrantes de este proyecto se han abocado a la investigación de nuevos antimicrobianos y a la síntesis y caracterización de nanomateriales. Relacionado directamente con este proyecto se realizaron los primeros estudios en nuestro país de síntesis de AgNPs por microorganismos, su caracterización y el estudio de su actividad antimicrobiana y antibiofilm. Se logró seleccionar las mejores condiciones de producción de AgNPs a partir de tres cepas de hongos y las nanopartículas fueron caracterizadas con técnicas complementarias. Asimismo, presentaron actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos, de interés en las áreas de la salud como agrícola-alimentaria, y se realizaron estudios de interacción de las nanopartículas con los microorganismos por Microscopía Raman Confocal, para avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción de las nanopartículas.

En cuanto a las aplicaciones de AgNPs biogénicas en el sector agrícola, se realizaron recientemente los primeros estudios en el país en semillas de trigo, para evaluar los efectos sobre germinación y protección, con promisorios resultados, en particular con las AgNPs producidas por una cepa de *Trichoderma harzianum*, seleccionada para esta propuesta. Además, se ha trabajado en la síntesis y caracterización de nanopartículas de quitosano, utilizando quitosano comercial de origen animal, y en sus diferentes aplicaciones, tal como la encapsulación de compuestos bioactivos para su uso en el control de microorganismos patógenos de alimentos. También se ha demostrado el efecto de inducción de resistencia de un quitosano

comercial en el patosistema *Allium cepa* – *Botrytis squamosa*, observándose que el tratamiento de plantas con quitosano previo a ser inoculadas con el patógeno reduce el desarrollo de la enfermedad. La quitina y el quitosano son polímeros estructurales, presentes en las paredes de los hongos, por lo que existen reportes de producción de quitosano a partir de distintos grupos de hongos.

El presente proyecto planteó la extracción y caracterización de quitosano de dos cepas de hongos basidiomicetes que presentaron, en trabajos previos realizados por el grupo, la capacidad de sintetizar AgNPs a partir del medio extracelular del hongo. Esto permitiría un aprovechamiento del micelio que es separado del medio extracelular, para la producción de quitosano. De esta manera se lograría la generación de dos materiales diferentes aprovechando la misma biomasa fúngica. Todas estas experiencias desde las diferentes disciplinas han sido plasmadas en producción científica asociada y han sido obtenidas como resultados de proyectos aprobados en los últimos años, así como de las tesis de posgrado de los jóvenes investigadores que integraron este proyecto.

Descripción de las problemáticas identificadas y contribuciones e impactos del proyecto

El proyecto se enmarca dentro de la problemática de la sustentabilidad de cultivos de importancia en el país como lo son arroz, trigo y cebolla. Se propone el desarrollo de un producto biotecnológico que permita tratar a los fitopatógenos, mitigando el uso de pesticidas tóxicos.

En cultivos de trigo, las esporas de *Fusarium graminearum* contaminan la espiga, lo que se traduce en reducción del rendimiento del grano, producción de micotoxinas y en semillas infectadas que pueden desarrollar enfermedades de implantación. En semillas de arroz, se han evaluado recubrimientos que incorporan fungicidas activos frente a hongos frecuentemente presentes en semillas (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.), con el objetivo de servir como la primera línea de defensa para semillas, mejorando la germinación, emergencia de plántulas, etc.

Por otro lado, el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) ocupa el tercer lugar por su Valor Bruto de Producción en la horticultura de Uruguay. La mancha blanca de la hoja causada por *Botrytis squamosa* es una enfermedad foliar muy extendida, principalmente en regiones de clima templado en Suramérica. Estudios sobre manejo de enfermedades que incluyan tratamientos químicos y biológicos alternativos son escasos en la región.

La sostenibilidad de la producción agropecuaria depende en gran medida de la búsqueda y el desarrollo de soluciones tecnológicas novedosas que impliquen un impacto reducido en el medio ambiente, teniendo como objetivo sustituir parcialmente el uso de agroquímicos y por ende disminuir los efectos negativos asociados a un uso continuado del mismo.

Particularmente, el uso de nanopartículas resulta muy promisorio. Trabajos recientes han demostrado su potencial uso tanto en el control de fitopatógenos debido a su actividad antimicrobiana, así como también en la promoción del crecimiento vegetal, aumentando la biodisponibilidad de nutrientes y contribuyendo a la adhesión microbiana beneficiosa para la rizosfera

El presente proyecto planteó la obtención de un producto nanotecnológico mediante mecanismos amigables con el medio ambiente, no sólo en la forma de producirlo sino también en su posible aplicación en plantas. Dada la probada eficacia de las AgNPs como antimicrobiano, se buscó combinar sus propiedades con las del quitosano con el fin de obtener un efecto sinérgico. En particular, para los ensayos de síntesis de quitosano y de nanopartículas a partir de hongos se utilizaron dos cepas de hongos basidiomicetes (*Phanerochaete chrysosporium* y *Punctularia atropurpurascens*) y una cepa de *Trichoderma harzianum* aislados en Uruguay que fueron seleccionados en trabajos previos por el grupo por producir AgNPs antimicrobianas. Dado que dichas AgNPs presentan carga superficial negativa, era de esperar que su asociación con el quitosano fuera favorable, resultando en la formación de nanohíbridos estables.

El objetivo general del proyecto fue, por un lado, el desarrollo de nuevos nanosistemas con actividad antimicrobiana frente a patógenos de interés en el sector agrícola y la producción de quitosano fúngico aprovechando la biomasa no utilizada en el proceso de síntesis de nanopartículas de plata. Por otro lado, se propuso la aplicación de los nuevos nanosistemas en semillas y en un sistema planta-patógeno. También se consideró parte fundamental del objetivo general la formación de recursos humanos en Nanobiotecnología y en la temática interdisciplinar del proyecto.

Los objetivos específicos del proyecto fueron los siguientes:

Evaluar la capacidad de los nanosistemas de controlar un fitopatógeno de plantas de cebolla, por su acción antifúngica (directa) o de inducción de respuesta de defensa en plantas (indirecta).

Formar recursos humanos a nivel de grado, posgrado e investigadores en proceso de consolidación en Nanobiotecnología y en la temática interdisciplinar del proyecto.

Sintetizar nanopartículas de quitosano y de plata con actividad antifúngica frente a patógenos de interés en el sector agrícola.

Desarrollar y caracterizar nanopartículas híbridas quitosano/plata evaluando sinergia en su actividad antifúngica.

Extraer quitosano del micelio fúngico obtenido de las síntesis de nanopartículas (el cual habitualmente se descarta en dicho proceso) y caracterizarlo.

Evaluar el efecto de los tratamientos con los nanosistemas en la protección y germinación de semillas de arroz y trigo

Metodología/Diseño del estudio

Biosíntesis de AgNPs

Se realizó como se describió previamente por el grupo. El micelio, obtenido de cultivo líquido, fue incubado en agua destilada estéril. El micelio se separó del caldo extracelular mediante filtración. Al extracto extracelular se le añadió solución de AgNO₃, incubándose en oscuridad. El incremento de absorción en el pico de longitud de onda correspondiente a la resonancia de plasmón de superficie de las nanopartículas fue medido.

Extracción de quitosano fúngico

Se utilizó el micelio retenido en la filtración (habitualmente descartado). La extracción se llevó a cabo de acuerdo con reportes previos. La biomasa seca fue suspendida en una solución de NaOH 1M y autoclavada a 121°C durante 15 minutos. La fracción insoluble se separó por centrifugación, se lavó con agua destilada hasta alcanzar la neutralización (pH 7) y luego se extrajo en ácido acético al 2%, a 95°C durante 8 horas. Después de centrifugar, se añadió NaOH 2M al sobrenadante hasta ajustar el pH a 10. El precipitado de quitosano fúngico se centrifugó, se lavó con agua, etanol al 95% y acetona, y se secó a 60-70°C hasta peso constante. La humedad se determinó mediante secado en estufa a 105°C hasta masa constante para calcular el rendimiento de la extracción.

Caracterización de quitosano

Se determinó el peso molecular mediante medidas de viscosidad en un viscosímetro capilar Ubbelohde, calculando la viscosidad intrínseca y utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. El grado de desacetilación se determinó a través de espectros de FT-IR, mientras que la solubilidad se evaluó mediante el porcentaje de materia seca solubilizada en ácido acético al 1% después de 24 horas a 25°C. La viscosidad se midió en ácido acético al 1% v/v a 25°C con un viscosímetro rotacional. La estabilidad térmica, la humedad y el contenido de cenizas fueron determinados mediante análisis termogravimétrico en un equipo de análisis térmico (TGA), calentando cápsulas de platino hasta 800°C a una velocidad de 10°C por minuto bajo atmósfera de aire y N₂ con un flujo de gas de 50 mL por minuto.

Producción de nanopartículas de quitosano y nanohíbridos Ag/quitosano

Se utilizó el método optimizado por el grupo. Se prepararon soluciones de quitosano en ácido acético al 0,1% (v/v) y se ajustó el pH a 6,0. A la solución de quitosano se le añadió gota a gota y con agitación una solución de TPP. Después de obtener las nanopartículas, se separaron mediante centrifugación. La síntesis de nanohíbridos se realizó siguiendo el mismo procedimiento, con la modificación de añadir gota a gota una solución de AgNPs.

Caracterización de las nanopartículas

Se realizaron mediciones de tamaño mediante Dynamic Light Scattering, difracción de rayos X, y potencial Z, lo que indicó la estabilidad de las nanopartículas en solución. La microscopía electrónica (TEM) permitió caracterizar adicionalmente el tamaño y la morfología. También se completó la caracterización química y estructural por espectroscopía UV y FTIR.

Actividad antifúngica in vitro

Se emplearon métodos estandarizados, como la determinación de la concentración inhibitoria mínima mediante la técnica de microdilución frente a hongos frecuentemente presentes en semillas (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*), disponibles en la Cátedra de Microbiología, para estudiar el espectro de acción antifúngica. Además, se incluyeron fitopatógenos evaluados en ensayos de desafío en semillas de trigo (*Fusarium graminearum*) y en plantas de cebolla (*Botrytis squamosa*).

Ensayos en semilla de trigo y arroz

Se evaluó la inocuidad de los tratamientos, la capacidad de promoción de germinación y el control de los microorganismos presentes en el sistema de manera natural. Se realizaron ensayos in vitro en placas, sembrando en PDA semillas con y sin tratamiento, con quitosano comercial, AgNPs y nanohíbridos. Se realizaron los correspondientes análisis estadísticos (ANOVA, Test de Tukey).

Inducción de resistencia en planta de cebolla

Tres días antes de ser inoculadas con el patógeno (*B. squamosa*), las plantas adultas de cebolla (variedad Pantanoso del Sauce) fueron tratadas con los nanosistemas o con quitosano mediante asperjado de hojas. La inoculación se realizó asperjando una suspensión de conidios (1×10^7 esporas/ml). Se evaluaron cuatro tratamientos (arreglo factorial 2×2): plantas sin inductor y sin inocular; con inductor y sin inocular; sin inductor e inoculadas; con inductor e inoculadas. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento (17°C , 100% de humedad relativa, 10 horas diarias de luz) hasta la evaluación de síntomas y la toma de muestras, ocho días después de la inoculación. Para determinar la actividad quitinasa, se realizaron extractos acuosos de proteínas solubles mediante abrasión de las muestras liofilizadas en mortero, bajo condiciones controladas de temperatura y pH. Los sobrenadantes lípidos se gel-filtraron en columnas PD-10 (Sephadex G25). La actividad quitinasa se determinó utilizando quitina azure como sustrato, definiendo la UE como la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.01 en la Abs_{560nm} en las condiciones de reacción (3 horas, 40°C , pH 5.6), como se reportó previamente por el grupo para la evaluación de quitosano comercial como inductor de resistencia en este patosistema. Se realizaron los análisis estadísticos correspondientes (ANOVA, Test de Tukey, modelo lineal generalizado).

Resultados, análisis y discusión

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO FÚNGICO

Se realizó un estudio para la obtención y caracterización de quitosano a partir de diferentes hongos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens*, *Trichoderma harzianum*, y *Rhizopus stolonifer*. El micelio de los hongos se produjo en medio PDB, optimizando variables como volumen de cultivo, número de discos inoculados y tiempo de incubación. Tras incubación, se recuperó el micelio por filtración y se secó a $60\text{--}65^\circ\text{C}$. Para extraer el quitosano, se aplicaron dos métodos que variaron la temperatura de tratamiento con NaOH en la primera etapa del proceso.

Se observó que solo *Rhizopus stolonifer* produjo quitosano, logrando por el método (incubación a 90°C) más eficiente, un rendimiento de 41,57 mg/g de micelio en 3 días de incubación. Otros hongos no generaron quitosano. Se evaluaron diferentes tiempos de incubación para *R. stolonifer*, encontrando que a mayor tiempo, menor rendimiento de quitosano, lo cual puede explicarse por la formación de un complejo entre quitina y glucano, dificultando su extracción.

El quitosano obtenido se caracterizó mediante análisis TGA, FT-IR y DRX. Los resultados mostraron que el quitosano extraído a partir de *R. stolonifer* es comparable con quitosano comercial, aunque con algunas impurezas menores. El análisis FT-IR confirmó la presencia de quitosano en el material extraído, mientras que el de DRX reveló similitudes entre el quitosano fúngico y dos tipos comerciales de diferente pureza.

SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) se realizó utilizando tres cepas de hongos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens* y *Trichoderma harzianum*. Para su síntesis, se incubó el micelio de los hongos en agua destilada estéril, y el extracto extracelular resultante se mezcló con una solución de AgNO_3 , incubándose en la oscuridad. Las AgNPs obtenidas fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-visible, dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z. El análisis mostró picos de resonancia de plasmón de superficie a 420 nm y diámetros promedio de 20-26 nm con baja polidispersidad (PDI $<0,4$). Además, el potencial Z indicó una carga superficial negativa en las nanopartículas, sugiriendo estabilidad coloidal.

La síntesis biológica presenta ventajas sobre métodos físicos y químicos al utilizar procesos menos tóxicos y ambientalmente sostenibles. Las AgNPs biogénicas son de especial interés debido a sus aplicaciones antimicrobianas, gracias a su capacidad para interactuar con las paredes celulares de microorganismos y generar especies reactivas de oxígeno. Estos nanomateriales son ampliamente investigados por sus aplicaciones en la detección y control de patógenos en microbiología, además de sus usos en biomedicina y el desarrollo de nuevos materiales compuestos.

La síntesis verde, empleando hongos como agentes reductores y estabilizantes, demuestra la capacidad de estas especies para producir nanopartículas con propiedades únicas, lo que abre nuevas posibilidades en la nanotecnología aplicada a la microbiología.

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO

Las nanopartículas de quitosano (CSNPs) se obtuvieron mediante el proceso de gelación iónica. En el proceso de síntesis, se

modificaron diferentes parámetros que permitieron reducir el tamaño de las partículas y obtener una baja polidispersidad. El tamaño de las partículas sintetizadas por Dispersión de Luz Dinámica (DLS), fue de diámetros hidrodinámicos entre 131 nm y 240 nm, con un índice de polidispersidad (PDI) entre 0,1 y 0,4. Estos valores indicaron una distribución uniforme de las partículas. Adicionalmente, la carga superficial de las nanopartículas, medida a través del potencial Z, se mantuvo en un rango de +2 a +21 mV, lo que sugiere una estabilidad coloidal aceptable.

SÍNTESIS DE NANOHÍBRIDOS QUITOSANO-PLATA

Los nanohíbridos de quitosano y nanopartículas de plata (CS-Ag) se sintetizaron utilizando quitosano a diferentes concentraciones y nanopartículas de plata biogénicas (PaNPs, ThNPs y PchNPs). Las soluciones de quitosano se dejaron en agitación continua durante 24 horas antes de añadir las nanopartículas de plata de manera controlada, manteniéndolas en agitación por cinco horas adicionales. Tras este proceso, los nanohíbridos se centrifugaron, lavaron y caracterizaron mediante espectroscopía UV-visible, DLS y mediciones de potencial Z.

Los espectros UV-visible mostraron picos de absorción entre 400 y 420 nm para los nanohíbridos sintetizados, lo que indica la estabilidad de las nanopartículas de plata en los sistemas híbridos. Las mediciones por DLS revelaron tamaños de partículas que variaron según el tipo de nanopartícula y la concentración de quitosano. En el caso de las PaNPs, los diámetros oscilaron entre 26 y 77 nm, mientras que para las PchNPs, los tamaños se mantuvieron en torno a los 115-143 nm. Por su parte, los nanohíbridos con ThNPs presentaron un incremento en el tamaño de las partículas conforme aumentaba la concentración de quitosano, alcanzando diámetros de hasta 571 nm.

El análisis del potencial Z mostró que todas las muestras de nanohíbridos poseían cargas superficiales positivas, lo que es consistente con la naturaleza del quitosano, que tiene un potencial Z de +53 mV.

El análisis mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) permitió confirmar la interacción entre el quitosano y las nanopartículas de plata a través de los grupos funcionales característicos de ambos componentes. Además, las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron nanopartículas esféricas con un tamaño promedio de 65 ± 35 nm, coherente con los datos obtenidos por DLS.

Estos resultados evidencian la síntesis exitosa de nanopartículas de quitosano y nanohíbridos CS-Ag con características físicas y químicas adecuadas para aplicaciones biotecnológicas.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS NANOSISTEMAS

Se evaluó la actividad antifúngica de nanopartículas de quitosano (CSNPs), nanopartículas de plata biogénicas (AgNPs) y nanohíbridos (NH) frente a fitopatógenos agrícolas.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):

Se determinó la CIM de los nanosistemas frente a esporas fúngicas. Las nanopartículas de quitosano no mostraron actividad antifúngica significativa, mientras que las nanopartículas de plata y los nanohíbridos exhibieron una inhibición efectiva a bajas concentraciones. En algunos casos, los NH lograron inhibir el crecimiento fúngico a concentraciones menores que las AgNPs, sugiriendo un efecto sinérgico entre los componentes.

Inhibición del Crecimiento Micelial:

Se evaluó la inhibición del crecimiento del micelio de fitopatógenos de arroz (*Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*) y cebolla (*Botrytis squamosa*) en placas con nanomateriales. Los resultados expresados como CE50 mostraron que las CSNPs inhibieron parcialmente el crecimiento de *S. oryzae* (15% a 0,4 mg/mL), mientras que las AgNPs y NH tuvieron una mayor actividad antifúngica.

Comparación de Efectividad a la Misma Concentración:

Al comparar los porcentajes de inhibición a una misma concentración, los nanohíbridos NH Pa y NH Pch mostraron inhibición significativa (61% y 33% frente a *S. oryzae*, respectivamente), superando la efectividad de las AgNPs individuales. Frente a *R. oryzae-sativae*, la inhibición varió entre 18-31%, excepto para las PaNPs, que inhibieron solo el 5%. Para *B. squamosa*, los NH y las AgNPs mostraron inhibición del 31-44%, con la excepción de las PaNPs, que no mostraron actividad.

Estos resultados indican que los NH y AgNPs biogénicas son prometedores como agentes antifúngicos en la agricultura, especialmente en el control de fitopatógenos específicos.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS NANOMATERIALES EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Los ensayos in vitro permitieron evaluar el efecto de diferentes nanomateriales sobre la germinación de semillas de trigo y arroz. Los resultados no mostraron efectos negativos significativos en los porcentajes de germinación en comparación con los controles. En las semillas de trigo tratadas con los nanohíbridos NH Th1, se observó una tendencia leve a incrementar la germinación, lo que sugiere un posible efecto beneficioso de este tratamiento. Sin embargo, las diferencias no fueron

estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos.

En el caso de las semillas de arroz, los porcentajes de germinación fueron similares a los del control, sin diferencias significativas en los tratamientos evaluados. Estos resultados son alentadores, ya que demuestran que los nanomateriales no afectan negativamente la germinación de las semillas, lo que sugiere su potencial aplicación en la agricultura. Además, refuerzan la idea de que estos nanomateriales pueden ser usados como herramientas para el control de fitopatógenos sin comprometer el crecimiento inicial de las plantas, como se evidenció en estudios previos sobre su actividad antifúngica.

INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN PLANTAS DE CEBOLLA5.

El estudio sobre la inducción de resistencia en plantas de cebolla (*Allium cepa*) mediante nanosistemas basados en quitosano tuvo como objetivo evaluar su potencial frente al patógeno *Botrytis squamosa*. Durante agosto y septiembre de 2023 se realizaron ensayos con plantas tratadas con distintos compuestos de quitosano y luego expuestas al patógeno. Los tratamientos incluyeron quitosano comercial, nanopartículas de quitosano y nanohíbridos de plata-quitosano, comparados con un grupo control. Se evaluaron los síntomas y la actividad de enzimas relacionadas con la patogénesis, como peroxidasas, glucanasas, quitinasas y N-acetilglucosaminidasas.

Los ensayos utilizaron plantas de cebolla de la variedad Regia, con 160 días de crecimiento en el ensayo de agosto y 205 días en el de septiembre. Tres días antes de la inoculación con *B. squamosa*, las plantas fueron tratadas con los compuestos mencionados. Luego, la mitad de las plantas de cada grupo fueron inoculadas con una suspensión de esporas del patógeno, mientras que la otra mitad fue asperjada con agua estéril. Después de 8 días de inoculación, se realizaron evaluaciones de síntomas y análisis enzimáticos.

Resultados de la evaluación de síntomas

En ambos ensayos, las plantas tratadas con compuestos basados en quitosano presentaron significativamente menos síntomas de necrosis foliar que las plantas no tratadas. En el segundo ensayo, las plantas pretratadas con nanopartículas y nanohíbridos también presentaron una marcada disminución de los síntomas, lo que sugiere que estos nanosistemas ofrecen un nivel de protección efectivo contra *B. squamosa*.

Evaluación de las actividades enzimáticas

Para determinar si los tratamientos inducían resistencia, se midió la actividad de varias enzimas en las hojas de las plantas. Las actividades de las enzimas quitinasa y N-acetilglucosaminidasa aumentaron significativamente en las plantas tratadas con nanohíbridos de plata-quitosano antes de la inoculación, indicando una posible inducción de resistencia. Sin embargo, la actividad de la peroxidasa fue reducida por los nanohíbridos, lo que sugiere que esta enzima no juega un papel central en la resistencia inducida por este tratamiento en particular.

Ocho días después de la inoculación, la actividad de peroxidasas aumentó notablemente en las plantas que no recibieron tratamiento previo, lo que sugiere una respuesta defensiva tardía en respuesta al daño. En las plantas tratadas con nanopartículas de quitosano y nanohíbridos, la actividad de esta enzima también aumentó, aunque en menor medida, sugiriendo un fenómeno de "priming" o preparación del sistema de defensa. Por otro lado, la actividad de glucanasas aumentó en respuesta a la inoculación en plantas pretratadas con nanohíbridos, pero no en aquellas tratadas con otros compuestos.

DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones en revistas científicas arbitradas

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

Vásquez Noheilly, Elizalde, V., Castro, A., Miraballes, I., Pardo, H., Alborés, S.

MRS Advances, 2023

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

Production and characterization of fungal chitosan from *Rhizopus stolonifer* (Completo, 2023) Cardoso, M., Pardo, H., Alborés, S., Arrarte, E. MRS Advances, 2023

<http://dx.doi.org/10.1557/s43580-023-00636-9>

Presentaciones en eventos

Presentación realizada por la Dra. Silvana Alborés como Prof. Invitada en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Los

hongos y la nanotecnología: un largo y ramificado camino de aprendizajes interdisciplinarios (2024).

XV Congreso Nacional de Microbiología organizado por la Sociedad Uruguaya de Microbiología.. Síntesis de nanohíbridos quitosano-nanopartículas de plata biogénicas con actividad antifúngica frente a fitopatógenos de interés agrícola Noheilly Vasquez , Helena Pardo , Silvana Alborés. Presentación de poster por Noheilly Vasquez. (2024).

Desarrollo de nanohíbridos quitosano-nanopartículas de plata biogénicas con actividad antifúngica frente a fitopatógenos Vásquez Noheilly , Pardo, H. , Alborés, S. VIII Encuentro Nacional de Química. Presentación de poster por Noheilly Vasquez (2023)

Obtención y caracterización de quitosano fúngico. Cardoso, M. , Pardo, H. , Alborés, S. , Arrarte, E. II Encuentro de Investigadores en Ciencia de Materiales Presentación de poster por Mauricio Cardoso (2023)

Desarrollo y caracterización de nanohíbridos quitosano-nanopartículas de plata biogénicas con potencial aplicación en agroalimentos (2023) Vasquez, N. , Elizalde, V. , Castro, A. , Pardo, H. , Alborés, S. II Encuentro de Investigadores en Ciencia de Materiales. Presentación de poster por Noheilly Vasquez (2023)

Producción y caracterización de quitosano fúngico obtenido de Rhizopus stolonifer. XV Simposio Argentino de Polímeros -I Congreso Argentino de Materiales Compuestos. Mar del Plata, Argentina. Mauricio Cardoso, Helena Pardo, Silvana Albores , Eloísa Arrarte. Poster presentado por Mauricio Cardoso. (2023).

Desarrollo de nanomateriales de quitosano y plata para el control de fitopatógenos.. ciclo 2023 de Seminarios del DEPPIO. en la Facultad de química- UDELAR. Presentación oral realizada por Noheilly Vasquez (2023).

Desarrollo de nanomateriales de quitosano y plata para el control de fitopatógenos. IV Simposio Latinoamericano de Biotecnología. Brasil. Vásquez, Pardo, H. ; Albores, S. .

Presentación oral realizada por Noheilly Vasquez. (2022)

IMPACTOS ECONÓMICOS, AMBIENTALES, SOCIALES

Los problemas ambientales causados por polímeros sintéticos han impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles, como los biopolímeros basados en quitosano. En este proyecto se obtuvieron resultados promisorios para la producción y utilización de quitosano en aplicaciones de interés biotecnológico, así como en el empleo de metodologías amigables con el ambiente, como la síntesis biológica de nanopartículas.

Los resultados obtenidos en el proyecto, que muestran el potencial de la nanobiotecnología en el manejo de enfermedades vegetales, fueron presentados en la Jornada Interdisciplinaria "Nanotecnología Aplicada en la Agricultura: ejemplos, avances y desafíos", organizada en Facultad de Química, en el marco del proyecto, con la participación de investigadores , estudiantes y actores del sector productivo de distintas instituciones y empresas interesadas en la temática.

Asimismo, este proyecto contribuyó en la formación interdisciplinaria de recursos humanos, tanto de posgrado y grado, como de jóvenes investigadores en etapas de consolidación. Por otro lado, permitió abrir nuevas líneas de investigación que se proyectaran en los próximos años con la incorporación al grupo de nuevos investigadores de distintas disciplinas y experiencias, y el inicio de nuevos posgrados interdisciplinarios.

Por último, mediante diversas actividades de divulgación y comunicación científica se logró llegar a un público amplio, contribuyendo al conocimiento de la investigación en el Uruguay, en particular en temáticas de nanobiotecnología con aplicaciones en diversas áreas relevantes para nuestro país.

ACTIVIDADES DE EXTENSIÓN, RELACIONAMIENTO CON EL MEDIO, DIVULGACIÓN

Organización de la Jornada Interdisciplinaria de Nanotecnología Aplicada a la Agricultura, realizada en Facultad de Química, Diciembre 2023.

- Conferencia de apertura: Nanotecnología Aplicada a la Agricultura: ejemplos, avances y desafíos Expositora Dra. Silvana Alborés.
- Además participaron de exposición oral, difundiendo los resultados de este proyecto, Dra. Eloisa Arrarte, Lic. Pablo Galeano, MSc. Noheilly Vasquez.

La Jornada fue difundida y dirigida tanto a actores de la academia como sector productivo.

Participación de la Dra. Alborés como investigadora responsable en las actividades ofrecidas a centros educativos del Uruguay (escolares, liceales) en el Programa Científicos en el Aula de Plan Ceibal-PEDECIBA. 2022 y 2023.

Participación de la Dra. Alborés en Jornada de Mujeres en Nanotecnología en UTU, en Departamento de Artigas, Uruguay.

Agosto 2023.

Participación de la Dra. Alborés en Semana de la Ciencia y la Tecnología realizando talleres titulados Microorganismos y sus aplicaciones biotecnológicas y nanotecnológicas, dirigidas a estudiantes de bachillerato en Instituto Pre-Universitario Juan XXIII, Colegio Integral de Montevideo, y UTU en Polo Tecnológico de Pando. Junio 2024.

Conclusiones y recomendaciones

CONCLUSIONES FINALES DEL PROYECTO

Extracción y caracterización de quitosano fúngico

Si bien no se logró obtener quitosano de los hongos *P. chrysosporium*, *T. harzarium* y *P. atropurpurascens*, a partir de *Rhizopus stolonifer*, se extrajo quitosano exitosamente, con mayores rendimientos a los reportados en la literatura. Los rendimientos disminuyeron con mayor tiempo de incubación, probablemente por la formación de complejos quitina/quitosano-glucano. El quitosano obtenido fue caracterizado por TGA, FT-IR y DRX, mostrando similitudes con quitosano comercial.

Síntesis y caracterización de nanomateriales.

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

Evaluación antifúngica frente a fitopatógenos de interés agrícola.

Tanto las AgNPs biogénicas como los NH CS-Ag evaluados, demostraron un amplio espectro antifúngico.

Los NH Pch y NH Pa mostraron mayor actividad antifúngica que las PchNP y PaNP, respectivamente, lo que demuestra el relevante aporte de ese proyecto en el desarrollo de nuevos nanomateriales que podrían ser utilizados a muy bajas concentraciones para controlar hongos fitopatógenos en la agricultura.

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

Al evaluar el efecto de los nanomateriales 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 nanomateriales 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 nanomateriales

Los tratamientos con los nanomateriales desarrollados en este proyecto (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. En cuanto a los resultados de actividades enzimáticas tanto la actividad peroxdasa, glucuronidasa y quitinasa, aumentaron el daño provocado por el patógeno, pero tienen un rol en su contención en plantas pretratadas con Nanoquitosano y Nanohíbrido, sugiriendo que el rol de estas enzimas en la respuesta al patógeno y en la resistencia inducida es dependiente del estado fenológico de la planta. 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.

En conclusión, este estudio muestra que los nanosistemas basados en quitosano, en particular las nanopartículas y los nanohíbridos, pueden actuar como inductores efectivos de resistencia en cebolla frente a *Botrytis squamosa*. Además, los resultados sugieren que la respuesta enzimática es un indicador clave de la resistencia inducida, con un aumento en las actividades de quitinasas y glucanasas que contribuyen a la contención del patógeno. Estos hallazgos abren nuevas posibilidades para el uso de nanotecnología en la protección de cultivos, proporcionando una herramienta prometedora para el control de enfermedades en plantas.

En este proyecto se obtuvieron resultados prometedores en la producción y aplicación de quitosano para usos biotecnológicos, además de implementar metodologías ambientalmente amigables, como la síntesis biológica de nanopartículas. Los resultados, que destacan el potencial de la nanobiotecnología en el control de enfermedades vegetales, fueron presentados en la Jornada Interdisciplinaria "Nanotecnología Aplicada en la Agricultura: ejemplos, avances y desafíos", organizada en la Facultad de Química como parte del proyecto. En este evento participaron investigadores, estudiantes y representantes del sector productivo de diversas instituciones y empresas interesadas en la temática.

Algunos de los resultados obtenidos fueron presentados en eventos especializados de diversas disciplinas y publicados en dos artículos en revistas científicas con arbitraje, así como en una tesis de Maestría en Biotecnología, la cual fue desarrollada con la beca vinculada al proyecto. Además, este proyecto ha sido clave en la formación interdisciplinaria de recursos humanos, abarcando tanto a estudiantes de grado y posgrado, como a jóvenes investigadores en proceso de consolidación.

Por último, se destaca la oportunidad de haber consolidado un área interdisciplinaria en nanobiotecnología que permitió la incorporación de nuevos investigadores, nuevas disciplinas y el inicio de nuevos posgrados, que darán continuidad en los próximos años al trabajo de investigación conjunto de los grupos participantes.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Tesis de maestría	Desarrollo de nanomateriales de quitosano y plata para el control de fitopatógenos	Noheilly Vasquez	BECA ANII_FMV_1_2021_1_167206	https://hdl.handle.net/20.500.12008/43915	Finalizado
Artículo científico	Development and characterization of chitosan–silver nanohybrids with potential application in the control of fungal phytopathogens	Noheilly Vásquez, Valeria Elizalde, Analía Castro, Iris Miraballes, Helena Pardo, Silvana Alborés	https://doi.org/10.1557/s43580-023-00650-x	https://hdl.handle.net/20.500.12381/5141	Finalizado
Artículo científico	Production and characterization of fungal chitosan from <i>Rhizopus stolonifer</i>	M. Cardoso · H. Pardo · S. Alborés · E. Arrarte	10.1557/s43580-023-00636-9	https://hdl.handle.net/20.500.12381/5140	Finalizado

Referencias bibliográficas

- A. G. Rodrigues, L. Y. Ping, P. D. Marcato, O. L. Alves, M. C. P. Silva, R. C. Ruiz, I. S. Melo, L. Tasic and A. O. De Souza, *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (2), 775-782 (2013).
- A. M. Elgorban, A. E. R. M. El-Samawaty, M. A. Yassin, S. R. Sayed, S. F. Adil, K. M. Elhindi, M. Bakri and M. Khan, *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 30 (1), 56-62 (2016).
- A. Martínez-Camacho, M. Cortez-Rocha, J. Ezquerro-Brauer, A. Graciano-Verdugo, F. Rodríguez-Félix, M. Castillo-Ortega, M. Yépiz-Gómez and M. Plascencia-Jatomea, *Carbohydrate Polymers* 82 (2), 305-315 (2010).
- C. a. L. S. I. (CLSI), *Approved Standard*, 10th Edition, CLSI 35 (2) (2015).
- E. R. Araújo, D. P. Alves and F. S. Higashikawa, *Tropical plant pathology* 43 (2), 160-164 (2018).
- F. N. Spagnoletti, C. Spedalieri, F. Kronberg and R. Giacometti, *Journal of Environmental Management* 231, 457-466 (2019).
- G. A. Achari and M. Kowshik, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (33), 8647-8661 (2018).
- G. Ruiz-de-la-Cruz, C. L. Aguirre-Mancilla, N. A. Godínez-Garrido, N. M. Osornio-Flores and J. A. Torres-Castillo, *Interciencia* 42 (5), 307-312 (2017).

G. S. Dhillon, S. K. Brar, S. Kaur and M. Verma, *Critical Reviews in Biotechnology* 32 (1), 49-73 (2012).

H. M. C. de Azeredo, *Trends in Food Science & Technology* 30 (1), 56-69 (2013).

<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-food-packaging-market> (2018).

I. L. Estanzuela, (2014).

J. S. Kumar, S. Umesha, K. S. Prasad and P. Niranjana, *Current Microbiology* 72 (3), 297-305 (2016).

J.-W. OH, S. C. Chun and M. Chandrasekaran, *Agronomy* 9 (1), 21 (2019).

J.-W. Rhim, H.-M. Park and C.-S. Ha, *Progress in Polymer Science* 38, 1629–1652 (2013).

K. Marsh and B. Bugusu, *Journal of Food Science* 72 (3), R39-R55 (2007).

K. Narula, E. Elagamey, M. A. E. Abdellatef, A. Sinha, S. Ghosh, N. Chakraborty and S. Chakraborty, *The Plant journal : for cell and molecular biology* 103 (2), 561-583 (2020).

L. Castañeda, C. Genro, I. Roggia, S. Bender, R. Bender and C. Pereira, *Journal of Research Updates in Polymer Science* 3, 33-39 (2014).

L. G. Adamuchio-Oliveira, S. M. Mazaro, G. Mógor, B. F. Sant'Anna-Santos and Á. F. Mógor, *Scientia Horticulturae* 271 (2020).

L. Grigore-Gurgu, F. I. Bucur, D. Borda, E.-A. Alexa, C. Neagu and A. I. Nicolau, in *Bacterial Biofilms* (IntechOpen, 2019).

L. Orzali, B. Corsi, C. Forni and L. Riccioni, (2017).

L. Yang, X. Li, C. Lai, Y. Fan, J. Ouyang and Q. Yong, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31 (6), 1160-1166 (2017).

M. a. K. Paterson, J. F., *Carbohydrate Polymers* (2003).

M. Aider, *LWT - Food Science and Technology* 43 (6), 837-842 (2010).

M. B. Estevez, M. L. Casaux, M. Fraga, R. Faccio and S. Alborés, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (314) (2021).

M. B. Estevez, S. G. Mitchell, R. Faccio and S. Alborés, *Materials Research Express* 6 (12), 1250f1255 (2020).

M. B. Estevez, S. Raffaelli, S. G. Mitchell, R. Faccio and S. Alborés, *Molecules* 25 (2023), 2023-2023 (2020).

M. Elsharkawy, A. Derbalah, A. Hamza and A. El-Shaer, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9 (2018).

M. Gonzalez Moreno, L. Wang, M. De Masi, T. Winkler, A. Trampuz and M. Di Luca, *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 74 (8), 2261-2268 (2019).

M. Guilger, T. Pasquoto-Stigliani, N. Bilesky-Jose, R. Grillo, P. C. Abhilash, L. F. Fraceto and R. d. Lima, *Scientific reports* 7, 44421 (2017).

M. Badawy. A new rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of a biopolymer chitosan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-7. (2012)

N. F. Castelo Branco Melo, B. L. de MendonçaSoares, K. Marques Diniz, C. Ferreira Leal, D. Canto, M. A. P. Flores, J. Henrique da Costa Tavares-Filho, A. Galembeck, T. L. Montenegro Stamford, T. Montenegro Stamford-Arnaud and T. C. Montenegro Stamford, *Postharvest Biology and Technology* 139, 56-66 (2018).

N. Kumaresapillai, R. A. Basha and R. Sathish, *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 10 (3), 553 (2011).

N. Peelman, P. Ragaert, B. De Meulenaer, D. Adons, R. Peeters, L. Cardon, F. Van Impe and F. Devlieghere, *Trends in Food Science & Technology* 32 (2), 128-141 (2013).

P. E. Sanguineto, M.B.; Faccio, R; Alborés, S., *Mundo Nano* 12 (22), 101-110 (2019).

P. Galeano, G. Galván and L. Franco Fraguas, *Encuentro Nacional de Química. Montevideo, Uruguay* (2017).

P. Galeano, P. H. González, L. F. Fraguas and G. A. Galván, *Tropical Plant Pathology* 39 (5), 374-383 (2014).

P. L. Colnago, *Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Uruguay* (2010).

P. Sanguineto, Fratila, R. M., Estevez, M. B., Martínez de la Fuente, J., Grazú, V., Alborés, S. , *Nano Biomedicine and Engineering* 10 (2), 156-164 (2018).

P. Zimet, Á. W. Mombrú, D. Mombrú, A. Castro, J. P. Villanueva, H. Pardo and C. Rufo, *Carbohydrate Polymers* 219, 334-343 (2019).

P. Zimet, Á. W. Mombrú, R. Faccio, G. Brugnini, I. Miraballes, C. Rufo and H. Pardo, *LWT* 91, 107-116 (2018).

R. Inês, M. Ying, S.-A. Pablo, V. Miroslav, F. Helena and S. O. Rui, *Frontiers in Plant Science* 10 (2019).

R. S. Riseh, M. Hassanisaadi, M. Vatankhah, S. A. Babaki, and E. A. Barka, 'Chitosan as a potential natural compound to manage plant diseases', *Int J Biol Macromol*, vol. 220, pp. 998–1009, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.08.109 (2022)

S. K. Kale, G. V. Parishwad and A. S. N. H. A. S. Patil, *ES Food & Agroforestry* 3, 17-22 (2021).

S. K. Shukla, A. K. Mishra, O. A. Arotiba and B. B. Mamba, *International Journal of Biological Macromolecules* 59, 46-58 (2013).

S. Kumar-Krishnan, E. Prokhorov, M. Hernández-Iturriaga, J. D. Mota-Morales, M. Vázquez-Lepe, Y. Kovalenko, I. C. Sanchez and G. Luna-Bárcenas, *European Polymer Journal* 67, 242-251 (2015).

S. Pedrini, D. J. Merritt, J. Stevens and K. Dixon, *Trends in Plant Science* 22 (2), 106-116 (2017).

T. Singh and C. Chittenden, *Forests* 12 (5), 542 (2021).

W.S. Paiva, Souza Neto, F. E., & Batista, A. C. L. Characterization of polymeric biomaterial chitosan extracted from *Rhizopus*

stolonifer. J. Polym. Mater, 34, 115-121. (2017).

X. Jia, H. Zeng, W. Wang, F. Zhang and H. Yin, Molecular plant-microbe interactions : MPMI 31 (12), 1271-1279 (2018).

Y.-K. Jo, W. Cromwell, H.-K. Jeong, J. Thorkelson, J.-H. Roh and D.-B. Shin, Crop Protection 74, 65-69 (2015).

Z. Ma, A. Garrido-Maestu and K. C. Jeong, Carbohydrate Polymers 176, 257-265 (2017).

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)

