



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ingeniería Química

*“Óxidos e Hidróxidos de Magnesio y Zinc Como
Fungicidas de Colletotrichum gloeosporioides Causante
de la Antracnosis del Aguacate y Papaya”*

Tesis

Presenta: **Mario Alberto Corral Aguado**

Ingeniero Químico

Asesores:

Dr. Pablo Genaro Martínez Torres

Dr. Reginaldo Mondragón Sánchez

Morelia, Michoacán

Marzo, 2017

Dedicatoria

A mis padres **Ramón Gabriel Corral Guzmán** y **Martha Aguado Zamudio** por su gran apoyo constante a lo largo de mi vida, por darme la confianza y creer en mí en todo momento, por la educación y los valores que siempre recibí. A mi padre por su gran ejemplo de responsabilidad y trabajar duro para obtener lo que me proponga y a mi madre por su ejemplo de amar a nuestros seres queridos. Ya que sin el apoyo de ellos no sería posible éste gran logro en mi vida.

A mis hermanos **Alejandro Corral Aguado** y **Gabriela Corral Aguado** por ese gran amor fraternal y apoyo que existe en nosotros, por sus consejos en momentos difíciles y por el ejemplo de responsabilidad y dedicación a sus responsabilidades, cualidades que han representado mucho en mis logros y en mi vida.

Agradecimientos

Al **Dr. Pablo Genaro Martínez Torres** por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su tutela y depositar su confianza en mí, por su amistad, sus consejos, por su gran sabiduría y paciencia, por el apoyo y ánimo que me brindo durante mis últimos años como estudiante y en el desarrollo de mi tesis para concluir mis estudios de licenciatura. Le agradezco todo el respaldo y apoyo que he recibido de usted.

Al **Dr. Reginaldo Mondragón Sánchez** por su gran sabiduría y conocimientos transmitidos durante mis últimos años de licenciatura, conocimientos que confirman una buena preparación a todos sus alumnos, por sus buenos consejos y constancia en su trabajo y por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su tutela en mi trabajo de tesis.

A la **Dra. Susana Del Carmen De La Rosa García** por haber aceptado mi petición de trabajar bajo su tutela, por su gran apoyo, el cual fue muy importante para llevar a cabo mi proyecto de tesis, por dedicar su tiempo y transmitirme sus conocimientos durante mi estancia en su laboratorio en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

A la **Dra. Nikte Marisela Gómez Ortiz** por su invaluable apoyo durante la trayectoria en la elaboración de mi proyecto de tesis, por sus consejos y su tiempo dedicado a orientarme, por su ayuda para poder llevar a cabo múltiples pruebas cruciales en este trabajo.

A los integrantes de la mesa de Jurado: **M.C Gabriel Martínez Herrera, M.C María Teresa Reyes Reyes**, por todas sus aportaciones y observaciones realizadas al presente proyecto, las cuales me ayudaron a mejorarlo.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** con la que siempre estaré en deuda por darme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y por su apoyo para culminar esta meta.

A mi amada **Facultad de Ingeniería Química** donde conocí gente increíble e inteligente, a todos los maestros que pertenecen a ella, personas altamente preparadas para su trabajo.

A **mis compañeros y amigos** que siempre estuvieron para mí cuando los necesité, por su gran apoyo en la escuela y en la vida.

I.- RESUMEN

Una de las principales fuentes de ingresos en el estado de Michoacán es la producción de aguacate, la cual aporta alrededor de un 86% a la producción total del país, mientras que México aporta 3 de cada 10 toneladas de aguacate que se producen en el mundo. Esto pone a México como el país exportador número uno de este fruto, superando el millón 300 mil toneladas anuales. Por otra parte, el estado de Michoacán también es uno de los principales productores de papaya, con una superficie sembrada de 1700 hectáreas, siendo México uno de los países de mayor producción y exportación de este fruto. Sin embargo, existen grandes pérdidas dentro de la industria agrícola debido a plagas o enfermedades que atacan a los frutos. Una de las pérdidas más fuertes se debe a una enfermedad conocida como antracnosis, la cual representa gran porcentaje de pérdidas.

En el presente trabajo se tiene como objetivo analizar el comportamiento y actividad inhibitoria de los óxidos de zinc, de magnesio, hidróxido de zinc, hidróxido de magnesio, así como también compósitos de óxido de zinc y óxido de magnesio en presencia del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis en gran variedad de frutos y vegetales. En esta investigación se propone una alternativa a los productos existentes en el mercado para combatir al hongo causante de la antracnosis en aguacate y papaya, partiendo desde la síntesis, caracterización de los compuestos y evaluación de los mismos en presencia del hongo a través de pruebas in vitro.

Antracnosis

Colletotrichum gloeosporioides

Aguacate

Papaya

Óxidos

II.- ABSTRACT

One of the main incomes in Michoacán is the avocado production, which contribute about 86 percent of the production in the country, while Mexico contributes 3 out of 10 tons production of avocado in the world. This puts México as the principal exporter of this fruit, surpassing a million three hundred thousand tons per year. On the other hand, the state of Michoacan is one of the principal producer of paw paw too, with 1700 hectares of surface planted, being Mexico one of the major producers and exporters of this fruit. However, great losses affect the agriculture industry due to pests and diseases which attack these fruits. One of the main losses is due to a disease known as anthracnose, which represents a large percentage of them.

The behavior and inhibitory activity of zinc and magnesium oxide, zinc and magnesium hydroxide and composites of zinc and magnesium oxide in presence of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose in a wide variety of fruits and vegetables are analyzed. In this investigation proposed an alternative to the products in the agriculture industry to combat the fungus causing the anthracnose in avocado and paw paw, starting from synthesis and characterization of these compounds then to evaluate these in presence of the fungus in vitro tests.

ÍNDICE

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen	V
Abstract	VI
Índice	VII
1. Introducción	
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	2
1.3 Antecedentes	3
1.4 Objetivos	5
2. Marco Teórico	
2.1 Introducción a la nanotecnología	6
2.2 Óxido de zinc	7
2.3 Óxido de magnesio	8
2.4 Cultivo aguacatero	8
2.5 Cultivo de papaya	10
2.6 Antracnosis	12
2.7 Hongos	14
2.8 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	15
3. Metodología	
3.1 Planeación del problema	17
3.2 Desarrollo experimental	17
3.3 Detalles experimentales	19
3.4 Método de coprecipitación	19
3.5 Método hidrotérmico	20
3.5.1 Síntesis de ZnO y compósitos	20

3.5.2 Síntesis de MgO	21
3.6 Métodos de caracterización	21
3.6.1 Microscopía electrónica de barrido	21
3.6.2 Difracción de rayos X	22
3.6.3 Reflectancia difusa	22
3.7 Determinación de la actividad antifúngica	23
4. Resultados y discusión	
4.1 Caracterización por difracción de rayos X	24
4.2 Caracterización por microscopía electrónica de barrido	26
4.2.1 Caracterización de ZnO y $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$	26
4.2.2 Caracterización de MgO y $Mg(OH)_2$	27
4.2.3 Caracterización de compósitos de MgO y ZnO	28
4.3 Determinación del ancho de banda prohibido	30
4.4 Análisis y pruebas de actividad antimicrobiana	32
4.4.1 Muestras de aguacate	32
4.4.2 Muestras de papaya	32
4.5 Actividad antifúngica de los nanomateriales sintetizados	32
5. Conclusiones y trabajo a futuro	
5.1 Conclusiones	38
5.2 Trabajos a futuro	39
6. Referencias	41

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Colletotrichum gloeosporioides es el principal hongo causante de la antracnosis en frutos, como son cítricos, mango, tomate, lechuga, guanábana, papaya, aguacate, entre otros. La antracnosis es la principal enfermedad poscosecha de los frutos, lo que ocasiona que la producción y exportación se vean afectadas, lo cual causa grandes daños en el fruto y en el campo. Se estima una pérdida de producción de un 25 a 40% a causa de problemas fitopatógenos, entre los cuales se encuentra la antracnosis, que perjudica la calidad del producto llegando a pérdidas millonarias (Lira-Saldivar, Hernández-Suárez, & Corrales-Flores, 2014). Los síntomas inicialmente se presentan en forma de exudados gomosos, posteriormente se notan pequeñas lesiones de 1 cm de diámetro de aspecto aceitoso y luego éstas se tornan de color café con halo amarillo que tienden a hundirse en el borde de la mancha; con el tiempo las lesiones persisten y se extienden a varias zonas del fruto, como se muestra en la figura 1. En la zona central de la lesión se observa un pequeño hundimiento y el centro es de color gris a café con puntos de color salmón o rosa en donde se ubican los acérvulos y en el interior los conidios (estructuras reproductivas). A medida que el fruto madura se presenta ablandamiento de la epidermis y el hongo coloniza más el fruto presentándose lesiones mayores a 3 cm (Edgar-Rodriguez et al; 2009).

Actualmente se realiza investigación de agentes antibacterianos y antifúngicos inorgánicos basados en óxidos metálicos, tales como óxido de zinc y óxido de magnesio, los cuales suelen ser empleados particularmente en tamaño de nanopartículas. Se ha mostrado que en este tamaño, estos nanomateriales tienen gran actividad antimicrobiana en diversos hongos y bacterias. Se tienen

antecedentes de su actividad en diversos microorganismos, pero hasta ahora no se ha reportado su actividad con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Una de las ventajas por las cuales estos cerámicos han sido muy estudiados en los últimos años es debido a su estabilidad a elevadas temperaturas y presiones, y también a que son considerados como materiales inocuos para el medio ambiente, sobre todo para las personas.



Figura 1. Síntomas de antracnosis en papaya (Ivonne A. Quiroga, Jhon Aldana, 2014).

1.2 Justificación

Debido a la creciente concientización de la sociedad ante el impacto ambiental causado por la industria agrícola, se tiene en la mira buscar nuevas alternativas que mitiguen estos efectos. Existen antecedentes de compuestos, como óxido de zinc y óxido de magnesio, que tienen una compatibilidad con el medio ambiente y

las personas; lo cual los coloca como excelentes candidatos para atacar enfermedades causadas por microorganismos.

Las nanopartículas existen en diferentes estructuras o formas físicas, como pueden ser nanocristales, nanopolvos, nanorracimos, nanotubos, nanovarillas, entre otros. Se considera nanopartículas cuando al menos una de sus 3 dimensiones es menor a 100 nm (Williams, 2006). En los últimos años la nanotecnología ha atraído mucha atención debido a las propiedades físicas y químicas adquiridas al llevarlas a un tamaño manométrico, las cuales suelen cambiar con respecto al material a granel.

La agricultura es un área donde las nuevas tecnologías se aplican para mejorar el rendimiento de los cultivos. Nanoagricultura implica el empleo de nanopartículas en la agricultura, considerando que estas nanopartículas ofrecerán algunos beneficios para los cultivos. La aparición de nuevos nanodispositivos y nanomateriales abre nuevas aplicaciones potenciales en la agricultura y la biotecnología (Lira-Saldivar et al., 2014). La nanotecnología es una de las más importantes innovaciones en el área científica. Las nanopartículas son un objetivo promisorio para la investigación científica debido a su amplia variedad de aplicaciones en distintas áreas, como en la medicina, biología, agricultura, química, óptica, electrónica, entre otros. En la industria agrícola son de gran importancia debido a su actividad antimicrobiana.

1.3 Antecedentes

La nanotecnología es una de las áreas más prometedoras de la ciencia y tecnología moderna con un gran impacto económico y social. En ella se trabaja con elementos extremadamente pequeños, como una millonésima parte de un milímetro. Para ello, el ser humano ha tenido que desarrollar técnicas que le permitan a futuro manipular la materia átomo por átomo (Rodríguez, 2012).

Cada año el sector privado y público en todo el mundo invierten para la investigación básica en nanotecnología entre 4 y 5 mil millones de dólares. Esto

convierte a la nanotecnología en el proyecto científico más grande financiado públicamente y se siguen promoviendo iniciativas en nanociencias para aumentar las inversiones. El número de artículos y patentes relacionados con la nanotecnología aumenta día con día (Rodríguez, 2012).

La nanotecnología representa una de las más novedosas innovaciones científicas, y en muchos sentidos, la de mayor alcance en lo referente a la alta tecnología para la agricultura. De hecho, se ha acuñado el término “nanobiotecnología”, que combina numerosas disciplinas científicas tan variadas como la biotecnología, la nanotecnología, el procesamiento químico, la ciencia de los materiales y la ingeniería de sistemas (Maine et al., 2013; Marambio y Hiek, 2010).

Una nueva herramienta para el control de enfermedades en plantas es el uso de nanotecnología, ya que su creciente desarrollo en las últimas décadas ha abierto nuevas posibilidades en el campo de la ciencia y la técnica que abarcan desde aplicaciones en electrónica, telecomunicaciones, bioquímica, medicina y biología entre muchas otras áreas. Específicamente, con el uso de nanopartículas de diferentes metales, como óxido de zinc, se anticipa un gran potencial en la agricultura (Lira-Saldivar, Ricardo-Hugo, 2015).

Para la agricultura, la nanotecnología se está aplicando para el tratamiento de algunas enfermedades de las plantas, para la detección precoz de los patógenos que las producen, para la mejora de la asimilación de nutrientes esenciales por las plantas. Su uso puede incrementar la eficacia de los pesticidas e insecticidas comerciales, reduciendo su cantidad de aplicación al suelo en unas dosis significativamente menores que las requeridas tradicionalmente en los cultivos; con la mejora medioambiental que eso implica. El futuro de la industria agrícola será usar estos materiales como nanopesticidas, nanofungicidas y nanoherbicidas y algunas empresas ya los están desarrollando. En definitiva, la aplicación de la nanotecnología a la agricultura es una alternativa menos dañina con el ambiente para el caso concreto del control de insectos y plagas, en comparación con otros métodos químicos que tantos problemas ambientales han generado (Rai & Ingle, 2012).

1.4 Objetivos

Como objetivo general, se propone el desarrollo y aplicación de compuestos nanométricos para combatir la enfermedad de la antracnosis en aguacate y papaya, partiendo de la síntesis de nanopartículas cerámicas a través de dos diferentes métodos de síntesis: coprecipitación e hidrotérmico.

1.4.1 Objetivos específicos

- Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de magnesio.
- Síntesis de compósitos a diferentes concentraciones de óxido de zinc y óxido de magnesio.
- Caracterización de los compuestos sintetizados mediante: difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis).
- Aislamiento de los hongos causantes de la antracnosis en aguacate y papaya.
- Aplicación de los compuestos en el área biológica para analizar su actividad antimicrobiana.
- Determinación del efecto fungicida o fungistático de los nanomateriales.
- Determinación de su concentración mínima de inhibición.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción a la nanotecnología

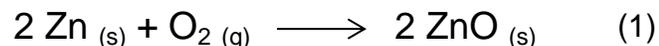
El prefijo nano en la palabra nanotecnología significa una milmillonésima (1×10^{-9}). La nanotecnología es el estudio y desarrollo de sistemas con dimensiones del orden de una milmillonésima parte de un metro. Las propiedades de los materiales a granel pueden ser modificadas cuando se reduce el tamaño de partícula a escala nanométrica (Charles P. Poole, Frank J. Owens., 2003), presentando propiedades que permiten el desarrollo de materiales y dispositivos con funcionalidades y características completamente nuevas que se rigen bajo las leyes de la mecánica cuántica. Estas nuevas propiedades son las que los científicos aprovechan para crear nuevos materiales (nanomateriales) o dispositivos nanotecnológicos. De esta forma, la nanotecnología promete soluciones a múltiples problemas que enfrenta actualmente la humanidad, como los ambientales, energéticos, de salud (nanomedicina), ingeniería y muchos otros. La composición del material puede ser cualquiera, si bien las más importantes son silicatos, carburos, nitruros, óxidos, boruros, seleniuros, telurios, sulfuros, haluros, aleaciones metálicas, intermetálicos, metales, polímeros orgánicos y materiales compuestos. Los tipos de nanomateriales que presentan una actividad más relevante incluyen (Palacio, 1998):

- Materiales nanoestructurados.
- Nanopartículas.
- Nanopolvos.
- Materiales nanoporosos.
- Nanofibras.
- Fullerenos.
- Nanotubos de carbono.
- Nanohilos.
- Dendrímeros.
- Electrónica molecular.
- Puntos cuánticos.
- Láminas delgadas.

Es importante señalar que la nanotecnología requiere de la participación de diversos campos del conocimiento, tales como la química, biología, informática, medicina, física, entre muchas otras ciencias y disciplinas. Cada una aporta la teoría y el trabajo práctico necesario para que las otras puedan partir de una base sobre la cual investigar y desarrollar algún objetivo.

2.2 Óxido de zinc

Los óxidos son compuestos inorgánicos binarios de oxígeno con otro elemento. Los óxidos se han preparado básicamente con todos los elementos, excepto con gases nobles. Se componen de dos tipos, óxidos ácidos y óxidos básicos. Los óxidos ácidos son compuestos formados por oxígeno y un elemento no metálico, mientras que los óxidos básicos son aquellos que se conforman de oxígeno y un elemento metálico. El zinc es un elemento metálico que al reaccionar con oxígeno forma óxido de zinc, un óxido básico.



El óxido de zinc es uno de los semiconductores que suscitan mayor interés tecnológico debido a sus numerosas aplicaciones. Durante las últimas décadas se ha mantenido vivo el reclamo de este óxido en la investigación debido a la existencia de numerosos campos de estudio aún por descubrir. En la actualidad es uno de los semiconductores más estudiados tanto en el desarrollo de nuevas técnicas de crecimiento que aporten nuevas propiedades físicas, como en el estudio de posibles aplicaciones tecnológicas que puedan llevarse a cabo.

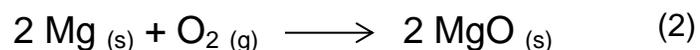
El óxido de zinc tiene un gran interés tecnológico en estructuras de baja dimensionalidad. Se pueden obtener múltiples nanoestructuras en forma de nanopartículas, nanohilos, nanofibra. Esto hace que el óxido de zinc adquiera gran interés en diversos nanosistemas, como son los dispositivos optoelectrónicos, biosensores, como pigmento en la producción de pinturas, así como su uso en la industria farmacéutica (en especial en el campo de la cosmética, donde se utiliza

como filtro de radiación ultravioleta en la producción de cremas solares). También es relevante su uso en transductores acústicos, en varistores, en sensores de gas, en electrodos transparentes, como ventana óptica en celdas solares, etc.

El óxido de zinc es un compuesto no tóxico y antibacteriano y actualmente se está investigando su incorporación en fertilizantes, pesticidas y herbicidas que permitan, entre otras cosas, un mayor crecimiento de los cultivos y una mayor protección de los mismos contra las enfermedades.

2.3 Óxido de magnesio

El óxido de magnesio, también conocido como magnesia, es una sustancia sólida mineral en forma de polvo color blanco, cuya fórmula es MgO, formada por un enlace iónico entre el catión magnesio y el anión óxido, forma hidróxido de magnesio en presencia de agua ($\text{MgO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2$), pero puede ser revertida por calentamiento para separar la humedad. Se trata de un óxido metálico de reacción:



Es higroscópico por naturaleza y se debe tener cuidado de proteger de la humedad. Por lo que es necesario almacenar separado de oxidantes fuertes y ácidos fuertes. El magnesio es usualmente empleado en fertilizantes y éste se presenta como óxido de magnesio.

2.4 Cultivo aguacatero

El aguacate (*Persea americana* Mill) es el único representante de importancia económica entre las frutas comestibles de la familia *Lauraceae* y es originario de México y Centro América. Presenta un creciente valor en el mercado internacional no solo por su calidad nutritiva, sino también por sus usos medicinales y en la

industria cosmética. Este delicioso fruto es muy conocido por el hombre desde hace milenios, así lo muestran las evidencias más antiguas de su consumo provenientes de una cueva en Coaxcatlán, Puebla, México; con una antigüedad de 7000 a 8000 años, y más allá de su uso comestible y procesado tiene amplias aplicaciones como materia prima para la extracción de aceite y en la industria cosmética (Fajardo-L, 2015).

El cultivo de aguacate (*Persea americana*) es una fuente económica muy importante para México, es de consumo creciente debido a su incorporación en la dieta y genera fuentes de empleos directos e indirectos en su cadena productiva. La creciente demanda del fruto de aguacate en el mundo ha sido factor importante para que se incremente la superficie cultivada. El aguacatero es afectado por varias enfermedades producidas por bacterias y hongos, entre las que se encuentran la pudrición de la raíz causada por el oomicete *Phytophthora cinamomni*, *Phytophthora* (*Phytophthora heveae* Thompson, *Phytophthora citrícola* Sawada y *Phytophthora palmivora*), como agentes causales de esta enfermedad. Otras patologías que afectan a este frutal son: la mancha negra (*Cercospora purpúrea* Cooke) y la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*).

2.4.1 Características botánicas

Como promedio, el árbol de aguacate puede alcanzar una altura de hasta 20 metros; sin embargo, cuando se cultiva en plantaciones comerciales, no se deja crecer más de 5 m, para facilitar las prácticas de control fitosanitario, cosecha, poda y fertilización foliar. Esta especie vegetal es de tronco grueso y con hojas alargadas, con varias ramificaciones que generan un follaje denso. Se considera un cultivo perenne debido a que se cultiva durante todo el año (Monografía de Cultivos, 2011).

El fruto es una drupa, en forma de pera, de color verde claro a verde oscuro y de violeta a negro, cáscara rugosa con una pulpa verde amarillenta y un hueso

central muy grande. Existen aproximadamente unas 400 variedades, por lo que podemos encontrar frutos de formas y pesos diferentes, que pueden llegar a pesar de 150 a 350 gr (Rodríguez, A. N., 2005). La tabla 1 muestra la taxonomía del *Persea americana Mill.*

Tabla 1. Taxonomía de *Persea americana Mill.*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lurales
Familia	Lauraceae
Género	Persea
Especie	Persea americana Mill

2.5 Cultivo de papaya

La papaya es un fruto originario de América Central, además de ser deliciosa posee incontables nutrientes que hacen de ella una fruta especial; la planta de papaya además es muy codiciada en los continentes africano y asiático por sus bondades medicinales (Bogantes, Mora, Umaña, & Loria, 2010)

La humedad y el calor son las condiciones esenciales para el buen desarrollo del papayo. Requiere zonas de una pluviometría media de 1800 mm anuales y una temperatura media anual de 20-22 ° C. Aunque puede resistir fríos ligeros, si no tiene la cantidad suficiente de calor, los frutos no llegan a madurar. No se debe cultivar en áreas propensas a heladas o a temperaturas por debajo de la de congelación, ya que éstas provocarían la muerte del vegetal. Las noches frescas y húmedas ocasionan que la fruta madure lentamente y resulte de mala calidad (Peter G. von Carlowitz, 1991)

La fructificación de la papaya se produce entre los 10 y 12 meses después del transplante. Anualmente un papayo produce unos cincuenta frutos, de los que se deben dejar para cosechar en plena madurez unos veinte y tomar los restantes aún verdes. El estado de recolección se alcanza cuando los frutos empiezan a

ablandarse y a perder el color verde del ápice. La madurez se alcanzará a los 4 ó 5 días de la recolección y los frutos tomarán un color amarillo (www.infoagro.com).

2.5.1 Características botánicas

La planta de papaya pertenece a la familia Caricáceas, del orden: Parietales, especie: *Carica*; es un árbol que posee un tallo único cilíndrico, aunque en ocasiones puede ramificarse, es recto y suave, en su interior es hueco, puede llegar a alcanzar una altura de entre 2 a 10 metros; sus hojas se apilan en la punta del tronco y las ramas son lisas, pero poseen nervadura irradiada y robusta, con base ancha y punta aguda, de coloración verde, o amarillo, con un pedúnculo redondeado verde con coloración violeta muy frágil, en la tabla 2 se muestra la taxonomía de la especie (Peter G. von Carlowitz, 1991).

Tiene frutos apiñados alrededor del tronco y bayas elipsoides a esféricas, tornándose de verdes a anaranjadas en la madurez, su pulpa es blanda y su jugo es lechoso. El fruto silvestre mide de 4 a 6 cm de largo y de 3 a 4.5 cm de ancho. Cada fruto contiene de 200 a 400 semillas. El fruto cultivado mide de 10 a 50 cm de largo, dependiendo del cultivo (Bogantes et al., 2010).

Tabla 2. Taxonomía de *Carica papaya*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Parietales
Familia	Caricáceas
Género	<i>Carica</i>
Especie	<i>Carica papaya</i>

2.6 Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad limitante que presentan muchas plantas, afectando la vida útil de éstas, se caracteriza por la presencia de manchas de diferentes colores que pueden afectar las hojas, los frutos, vástagos y las yemas. Estas anomalías son causadas por hongos de diferentes especies, principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides*, sin embargo es posible encontrar otras especies de *Colletotrichum* causando enfermedades en un mismo cultivo. Los síntomas de esta enfermedad dependen de la planta afectada; en los síntomas de la papaya se observan unas manchas hundidas de diversos colores en las hojas y necrosis en los nervios de éstas, tallos, frutos o flores, que muchas veces derivan en el marchitamiento y muerte de los tejidos, como se ve en la figura 2, también pueden aparecer a lo largo de las venas de las hojas unas manchas irregulares de color marrón claro correspondientes a tejido muerto; las plantas afectadas tendrán el aspecto de haber sido quemadas por el sol.



Figura 2. Evolución de los daños causados por antracnosis en la papaya.

En el aguacate, el hongo infecta principalmente frutos pequeños durante su crecimiento en los huertos. Produce un apresorio que penetra el fruto degradando la cutícula y produciendo una hifa subcuticular latente que no se desarrolla hasta que el fruto madura y presentando manchas negras en el fruto y en las hojas, como se ve en la figura 3. Puede llegar a infectar varias plantas desde árboles hasta hierba. Al dificultar la fotosíntesis, las hojas se tornan amarillas y rugosas hasta su destrucción total (E. Rodríguez, J. Gonzáles, N. Mayek, 2008).



Figura 3. Síntomas ocasionados por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de aguacate encontrados en Michoacán, México, Antracnosis (Morales, Azpíroz, y Pedraza, 2009).

La enfermedad es muy frecuente en localidades con climas frescos a fríos y alta humedad relativa mayor de 92%. Es favorecida por temperatura entre 13 y 26° C, con una óptima alrededor de 17 a 18° C, y lluvias moderadas a intervalos frecuentes; las lluvias acompañadas de vientos son muy importantes para la diseminación de las esporas del patógeno a corta distancia, de una planta a otra o de un surco a otro. La antracnosis es frecuente en localidades con elevaciones superiores a 1000 metros sobre el nivel del mar. Rara vez ocurre en lugares con clima seco y caliente (Corrales, 1995).

2.7 Hongos

Los hongos son organismos heterotróficos con filamentos en forma de hebras llamadas hifas, las cuales se desarrollan a partir de las esporas. Las esporas se alargan en sus puntas y en sus ramas hasta formar una red de filamentos llamada micelio. Obtienen su alimento mediante un proceso denominado digestión extracelular (fuera de las células del hongo) y posteriormente lo absorben de los productos de la digestión (A. Bisggs, C. Kapicka, México, 2000).

Durante la reproducción sexual o asexual, los hongos producen esporas que permiten su dispersión hacia nuevos lugares o les ayudan a sobrevivir en condiciones adversas, como la deshidratación o congelación. En ocasiones pueden desarrollarse a partir de cualquier fragmento de micelio (F. Bisby, Y. Roskov; Catalogue of Life, 2008).

La mayor parte de los hongos son saprofitos (descomponen la materia muerta), y juegan un papel de vital importancia en el mantenimiento de los ecosistemas, reciclando la materia orgánica que luego podrá ser utilizada por los vegetales. Por otro lado, hay varios miles de especies que parasitan a las plantas; de hecho, los hongos son los fitopatógenos por excelencia (G. Guzman, 1995).

2.8 *Colletotrichum gloeosporioides*

El género *Colletotrichum* presenta un número diverso de especies que incluye los patógenos y los saprofitos, como se ve en la figura 4. Las especies de este género son consideradas como las más exitosas dentro de los hongos patógenos de plantas y se presenta tanto en zonas templadas como tropicales. Este patógeno puede afectar gran parte de tejidos, órganos de la planta en desarrollo y frutos. Su capacidad para causar infecciones latentes lo ubican dentro de los patógenos de postcosecha más importantes.



Figura 4. *Colletotrichum gloeosporioides* ([http://techoagricola, 2011](http://techoagricola.com)).

Colletotrichum gloeosporioides es un microorganismo que en la naturaleza vive de la materia orgánica y en ocasiones especiales tiene la capacidad de volverse patógeno, prefiriendo atacar tejidos muy jóvenes o tejidos muy viejos y físicamente débiles. Los ataques más severos a los frutos ocurren cuando coincide el estado susceptible del cultivo (floración y/o fructificación) con un tiempo lluvioso y días de permanente humedad relativa elevada. En la tabla 3 se muestra su taxonomía.

Las fuentes de inóculo prácticamente se presentan en todo el árbol, desde las hojas, ramas, flores, etc., hasta el mismo fruto. La severidad de la enfermedad está relacionada con las condiciones del medio ambiente. El hongo se inactiva en

condiciones de clima seco, luz solar y temperaturas extremas (menor a 18° C o mayor a 28° C).

Colletotrichum se encuentra en la naturaleza en su estado asexual (o fase conidial), produce unas estructuras en forma de disco, con un diámetro de 300 µm, en forma subepidermal en la lesión llamados acérvulos; estos cuerpos presentan varias espinas o setas son de 4 a 9 µm de diámetro y menos de 100 µm de longitud, los cuales están ubicados al borde o entre la masa de conidióforos simples y alargados, las conidias.

Tabla 3. Taxonomía de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Glomerellales
Familia	Glomerellaceae
Género	Colletotrichum
Especie	Colletotrichum gloeosporioides

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Planeación del problema

El desarrollo de las actividades del presente proyecto consiste en las siguientes etapas:

- Investigación bibliográfica, cálculo y obtención de datos.
- Síntesis y caracterización de los compuestos.
- Determinación de la actividad antimicrobiana de los materiales sintetizados.
- Obtención y análisis de resultados.

La primera etapa consiste en realizar una revisión bibliográfica con la finalidad de obtener datos importantes acerca de los antecedentes de estos compuestos, indagar en la bibliografía para determinar las diferentes técnicas de síntesis y determinar el mejor método para los objetivos buscados en esta tesis.

La segunda etapa consiste en la síntesis y caracterización de los compuestos, la cual se explica en el siguiente apartado.

3.2 Desarrollo experimental

Se usaron dos métodos diferentes de síntesis para la preparación de los compuestos, métodos que son prácticos, eficientes y de preparación sencilla, lo cual es de gran ventaja para llevarlo a una escala industrial. Posteriormente, se llevará a cabo la caracterización de estos compuestos con técnicas como: microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y UV-vis. A partir de los resultados de estas técnicas se irá mejorando y/o variando las condiciones de síntesis para la manipulación de su estructura cristalina y tamaño de partícula,

llevándolo hasta un tamaño considerado dentro del estudio de nanotecnología. Una vez alcanzados estos objetivos, se evaluará su actividad aniquiladora o inhibitoria con hongos aislados provenientes de plantas de aguacate y papaya. En el caso del aguacate, se tomaron muestras en la localidad de Tecario, municipio de Tacámbaro, Michoacán. Las muestras de papaya se tomaron en el estado de Campeche. En la figura 5 se muestra un esquema de la metodología de síntesis.

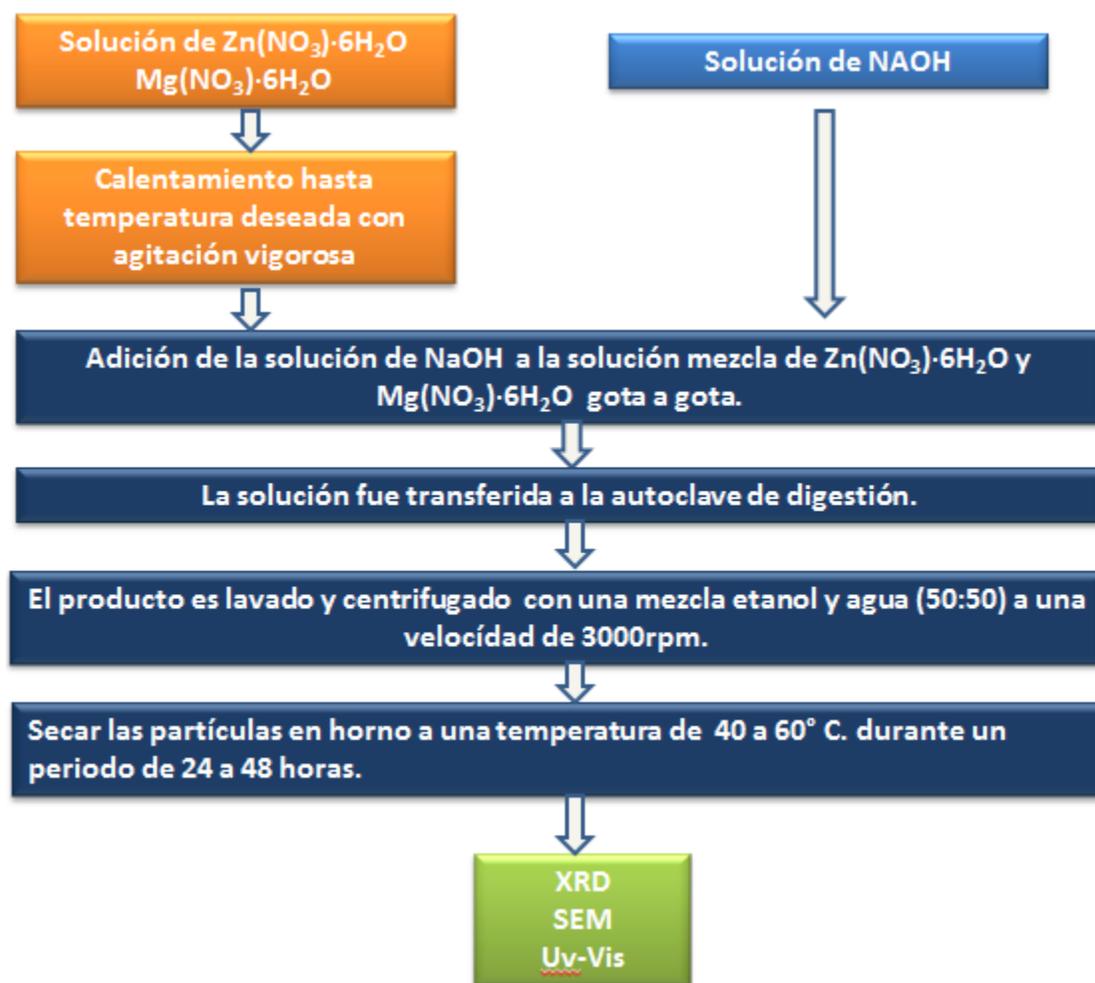


Figura 5. Esquema de síntesis de compósitos ZnO y MgO por método hidrotérmico.

3.3 Detalles experimentales

Las muestras de ZnO, MgO y compósitos de MgO y ZnO fueron sintetizadas bajo el mismo método y condiciones de preparación. La siguiente metodología aplica para estos tres compuestos.

3.4 Método de coprecipitación

3.4.1 Síntesis de ZnO, MgO y compósitos de MgO y ZnO

Las muestras de ZnO / MgO se prepararon por método de coprecipitación. La solución de ZnO / MgO se elaboró a partir de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich 98%) con una concentración de 0.2 M en 100 ml de agua desionizada. Para el caso de los compósitos de MgO y ZnO se preparó con los mismos reactivos con una relación 1:1 molar a una concentración de 0.2 M en 100 ml de agua desionizada siguiendo la misma metodología. La reacción se llevó a cabo a temperaturas constantes de 70° C, 50° C y 25° C en cada síntesis, con agitación vigorosa. Una vez alcanzadas dichas condiciones, se añadió una solución 0.4 M de NaOH (Aldrich 98%) con volumen de 100 ml, gota a gota por un tiempo aproximado de 2.5 horas, como se ve en la figura 6. Después, las muestras fueron lavadas con etanol y centrifugadas a una velocidad de 3000 rpm por 10 minutos, procedimiento que se repitió 3 veces. Posteriormente las muestras fueron secadas en un horno a temperatura constante de 50° C durante un tiempo de 24 a 48 horas obteniéndose hidróxido de zinc / magnesio. Por último, la muestra fue sometida a una temperatura de 500° C y 1000° C durante 2 horas con una rampa de calentamiento de 5° C/min para así obtener óxido de zinc, óxido de magnesio o compósitos de los óxidos. Estas síntesis fueron realizadas siguiendo a Tamilselvi, Yelilarasi, Hema, & Anbarasan (2013).

3.5 Método hidrotérmico

3.5.1 Síntesis de ZnO y compósitos de ZnO y Mg(OH)₂

Las muestras de ZnO y compósitos de ZnO y Mg(OH)₂ se prepararon por el método hidrotérmico. La solución de ZnO se elaboró a partir de Zn(NO₃)₂·6H₂O (Aldrich 98%) con una concentración de 0.2 M en 100 ml de agua desionizada, mientras que para los compósitos de ZnO y Mg(OH)₂ se preparó con los mismos reactivos que en el párrafo 3.3.1 con una relación 1:1 molar a una concentración 0.2 M en 100 ml de agua desionizada. La reacción se llevó a cabo a temperaturas constantes de 70° C, 50° C y 25° C con agitación vigorosa. Una vez alcanzadas dichas condiciones, se añadió 0.4 M de NaOH (Aldrich 98%) con volumen de 100 ml, gota a gota por un tiempo aproximado de 2.5 horas, como se ve en la figura 6; una vez mezcladas ambas soluciones, las muestras se sometieron a un tratamiento hidrotérmico que consiste en transferir la solución en una autoclave de digestión, sometiéndolas a temperaturas entre 100 y 160° C por un periodo de 24 horas.



Figura 6. Sistema para llevar a cabo la síntesis de los nanomateriales.

Se prepararon tres diferentes muestras variando la temperatura de tratamiento hidrotérmico. Una muestra fue tratada a temperatura de 100° C por un periodo de 24 horas, la segunda muestra a 160° C durante 24 horas y la tercera muestra fue tratada a temperatura de 100° C por un periodo de 24 horas y posteriormente fue llevada a una temperatura de 160° C durante 24 horas. Al término de este procedimiento las muestras se lavaron con etanol y centrifugadas a una velocidad de 3000 rpm durante 10 minutos, procedimiento que se repitió 3 veces. Posteriormente las muestras fueron secadas en un horno a temperatura constante de 50° C con un tiempo de 24 a 48 horas, obteniéndose así óxido de zinc y los compósitos (A. Corral-Aguado, P. Martínez-Torres, N. Gomez-Ortiz, J. Pichardo-Molina, Susana De la Rosa- García, 2016).

3.5.2 Síntesis de MgO

En el caso de óxido de magnesio, no fue posible su preparación por el método hidrotérmico. Para obtener óxido de magnesio a partir del hidróxido de magnesio que resulta de la primera parte de la síntesis, es necesario llevarlo a temperaturas que las autoclaves de digestión disponibles no son capaces de alcanzar, debido a esto, se obtuvo óxido de magnesio reactivo muy inestable que absorbe humedad del aire llevándose a cabo una reacción reversible ($MgO + H_2O \rightarrow Mg(OH)_2$).

3.6 Métodos de caracterización de materiales

3.6.1 Microscopía electrónica de barrido

Se tomaron micrografías en microscopio electrónico de barrido con la finalidad de observar la morfología y tamaño de partícula que presentan las nanopartículas de ZnO, MgO y compósitos de ZnO y MgO sintetizadas por método de hidrotérmico y de coprecipitación. La morfología, tamaño y distribución de las nanopartículas de los óxidos e hidróxidos de zinc y magnesio fueron analizados usando un equipo de

microscopía electrónica de barrido modelo FE-SEM-JEOL 6400 con aumentos de 75,000 X y 150,000 X.

3.6.2 Difracción de rayos X

Se realizaron estudios de difracción de rayos X para la caracterización de los materiales sintetizados, los cuales fueron llevados a cabo en un difractor Bruker modelo 2 Phaser con una geometría Bragg-Brentano y radiación emitida por una fuente de Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Los parámetros de barrido fueron los siguientes: tamaño de paso = 0.02° , tiempo de exposición = 0.5 s, rango de barrido $10^\circ \leq 2\theta \leq 90^\circ$. Con estos estudios se determinó la fase de material obtenido de las diferentes síntesis preparadas.

3.6.3 Reflectancia difusa Uv-Vis

La técnica de caracterización mediante espectroscopía ultravioleta-visible por reflectancia difusa (UV-Vis RD) proporciona información sobre el entorno de las especies metálicas y orgánicas presentes en el material, siempre que éstas presenten transiciones entre niveles moleculares separados por energías del orden de la región UV y/o visible de la radiación electromagnética. Permite estudiar las contribuciones de los componentes orgánicos e inorgánicos de las muestras, así como el entorno de algunos átomos metálicos. El equipo disponible es un espectrofotómetro equipado con un accesorio de reflectancia difusa (esfera de integración) a temperatura ambiente. En los espectros UV-Vis RD se grafica $F(R)$ frente a la longitud de onda, siendo $F(R)$ la función Kubelka Munk, que depende del valor de la reflectancia difusa y cuyo significado está relacionado con la transformación del espectro de reflectancia difusa a su equivalente en unidades de absorbancia (laboratorio de técnicas espectroscópicas; 2013).

3.7 Determinación de la actividad antifúngica

Se realizó la técnica de concentración mínima inhibitoria en el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* del aguacate y *Colletotrichum gloeosporioides* de la papaya y para ello se prepararon soluciones de 5 mg/mL teniendo como solvente dimetil sulfóxido con las muestras sintetizadas y caracterizadas previamente. Se empleó como medio de cultivo agar PDA (agar 15 g/L, dextrosa 20 g/L extracto de papa 4 g/L, pH 5.6 ± 0.2 (25° C. Con esta prueba se determinó la actividad de las muestras expuestas al hongo, confirmando su actividad antifúngica.

Se emplearon placas estériles de poliestireno para la microtitulación de 96 pocillos con fondo redondo. Fueron repartidos de la siguiente manera, en la primera columna se colocaron 200 µL de la solución de nanopartículas de ZnO, MgO y ZnO-MgO con concentración de 5 mg/mL con duplicado, en el resto de los pocillos se colocaron 100 µL de la solución de esporas con una concentración 1.5×10^6 esporas/mL. Posteriormente se fue diluyendo la solución de muestra de nanopartículas en un 50% desplazándose desde el primer pozo donde están depositadas las muestras de nanopartículas, así diluyendo la concentración de izquierda a derecha, consecutivamente en cada una de las filas de los pozos donde se depositaron las distintas muestras de los diferentes compuestos. Una vez depositadas todas las muestras, las placas fueron llevadas a incubación a temperatura de 30° C por un periodo de 48 a 72 horas para favorecer el desarrollo del hongo. Posteriormente fueron analizadas las placas en microscopio para verificar el crecimiento del hongo y así localizar el pozo en el cual comienza el crecimiento para poder determinar la concentración mínima de nanopartículas para inhibir el desarrollo del hongo *colletotrichum Gloeosporioides*.

Estas pruebas fueron realizadas de acuerdo a la metodología de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Microbiología, bajo la supervisión de la Dra. Susana del Carmen De La Rosa García.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Caracterización por difracción de rayos X

A continuación se muestran las gráficas de los patrones de difracción de rayos X, los cuales confirmaron que los materiales sintetizados por los diferentes métodos de preparación fueron llevados a cabo con éxito. En la figura 7 se muestran las gráficas de los resultados donde: (a) MgO, (b) ZnO y (c) Compósitos de MgO y ZnO; los patrones citados en Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) se marcan con diferentes símbolos azules, mientras que los resultados experimentales de forma lineal. Se observa que todos los picos coinciden de acuerdo a los patrones, a excepción de los compósitos (Fig 7 (c)), existen picos adicionales que corresponden al óxido de magnesio, que corresponden al patrón de difracción 00-004-0829 JCPDS.

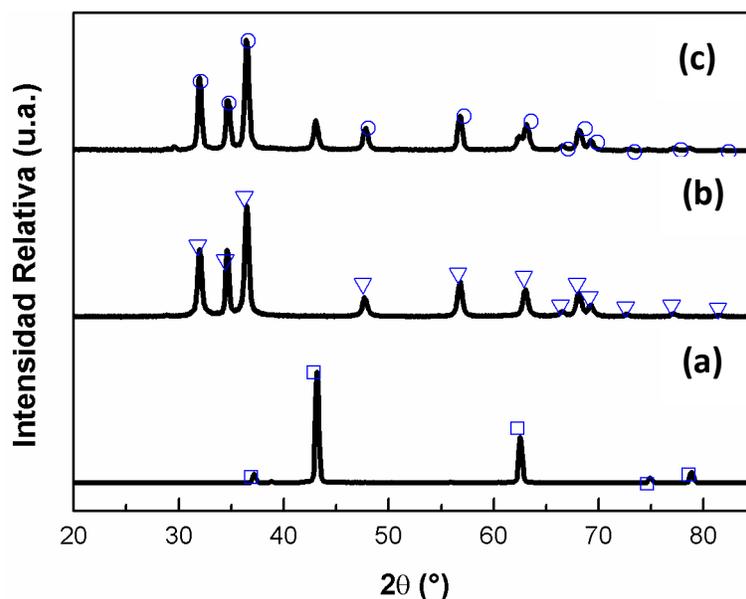


Figura 7. Patrones de difracción de rayos X de los nanomateriales sintetizados: (a) MgO; (b) ZnO; (c) compósitos de MgO y ZnO. Los patrones de difracción corresponden a los de JCPDS: No 00-04-0829 (a), No 00-036-1451 (b), No 01-076-8938.

En la figura 8 se presentan los patrones de difracción de rayos X de hidróxido de magnesio (a) e hidróxido nitrato de zinc dihidratado (b). Aunque en este difractograma se observa la presencia de zincita (triángulos invertidos azules). Esta última se encuentra sintetizada de manera pura, por lo que el hidróxido nitrato de zinc dihidratado se puede analizar como material de investigación, para estudiar sus propiedades fungicidas. Los compósitos de hidróxido de magnesio e hidróxido de zinc (c) corresponden a compósitos de hidróxido de magnesio con óxido de zinc, que no presenta contaminantes, pero no se observa la presencia de hidróxido de zinc.

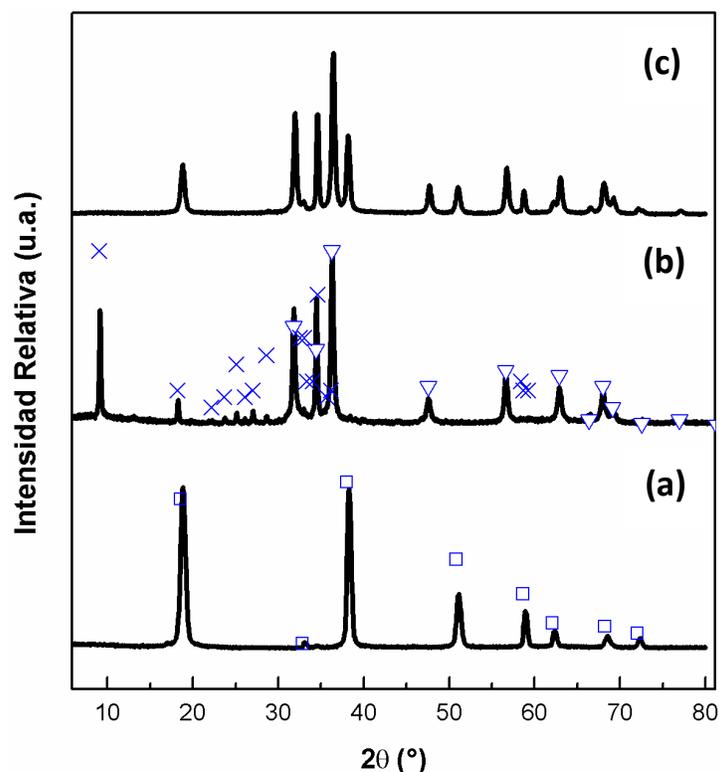


Figura 8. Patrones de difracción de rayos X de los nanomateriales sintetizados: (a) $\text{Mg}(\text{OH})_2$; (b) $\text{Zn}_5(\text{NO}_3)_2(\text{OH})_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; (c) compósitos de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ / ZnO . Los patrones de difracción corresponden a los de JCPDS: No 00-007-0239 (a), No 00-024-1460 (b) y No 000-07-0239 / 00-036-1451 (c).

4.2 Caracterización por microscopía electrónica de barrido

4.2.1 Caracterización de ZnO y $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$

En las y figuras 9 (a) y (b) se observa la morfología de ZnO por los dos diferentes métodos de preparación, hidrotérmico y coprecipitación, respectivamente. Por el método hidrotérmico se observa en la figura 9 (a) una estructura de varillas formando agregados con un tamaño promedio de partícula de 76 nm y desviación estándar de 42 nm, como se ilustra en la tabla 4; por el método de coprecipitación se observa en la figura 9(b) una morfología hexagonal bien definida con un tamaño promedio de partícula de 65 nm y una desviación estándar de 23 nm, que se ve en la tabla 4, mientras que para el hidróxido nitrato de zinc dihidratado se puede observar en la figura 9 (c) una morfología de partículas amorfas que forman agregados con una media de tamaño de partícula de 35 nm y una desviación estándar de 16 nm, que se ve en la tabla 4. Para determinar el tamaño de las partículas, las imágenes fueron analizadas con la ayuda del programa ImageJ.

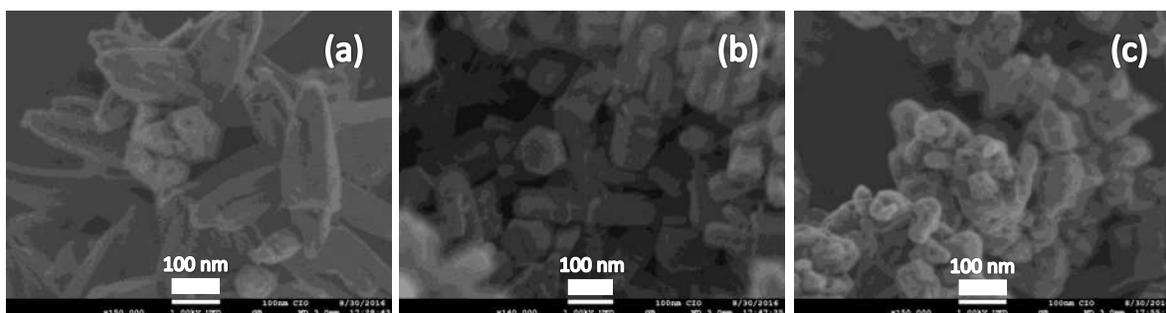


Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de: (a) partículas de ZnO por método hidrotérmico (b) partículas de ZnO por método de coprecipitación, (c) partículas de $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$.

A continuación se muestran los resultados de tamaño de partícula a diferentes tratamientos térmicos que fueron analizados con el programa ImageJ.

Tabla 4. Resultados de tamaño de partícula de ZnO y $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$

Fase	ZnO					$Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$
Método	Coprecipitación		Hidrotérmico			Coprecipitación
Temperatura, C	1000°	500°	100°	100-160°	160°	
Parámetros						
Promedio (nm)	65	48	77	76	57	35
SD (nm)	23	24	48	42	26	16
Mín (nm)	23	14	16	22	18	13
Máx (nm)	113	112	236	203	183	100

4.2.2 Caracterización de MgO y Mg(OH)₂

En las figuras 10 (a) y (b) se presentan las imágenes de las partículas de óxido e hidróxido de magnesio respectivamente, preparadas por el método de coprecipitación. Para el óxido de magnesio se observa en la figura 10 (a) una morfología de hojuelas que forman agregados, con un promedio de tamaño de partícula de 110 nm y una desviación estándar de 62 nm, que se nota en tabla 5; mientras que en las partículas de hidróxido de magnesio se observa en la figura 10 (b) una morfología de hojuelas bien definidas con una media de tamaño de partícula de 47 nm y una desviación estándar de 16 nm, que se nota en tabla 5.

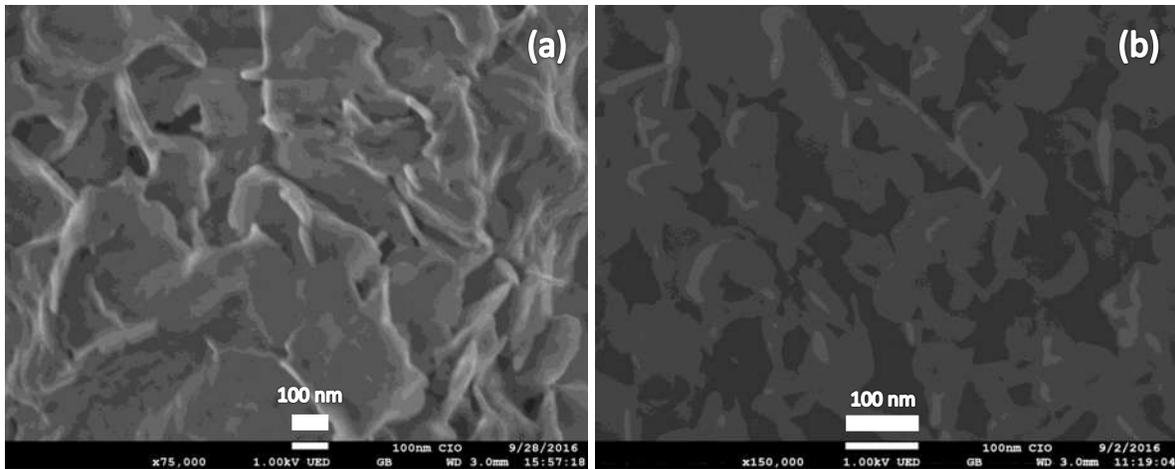


Figura 10. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de: (a) MgO por método de coprecipitación, (b) Mg(OH)₂.

A continuación se muestran los resultados de tamaño de partícula a diferentes tratamientos térmicos que fueron analizados con la ayuda del programa ImageJ.

Tabla 5. Resultados de tamaño de partícula de MgO y Mg(OH)₂ por coprecipitación.

Fase	MgO		Mg(OH) ₂
Temperatura, C	1000°	500°	
Parámetros			
Promedio (nm)	147	110	47
SD (nm)	47	62	16
Mín (nm)	65	22	14
Máx (nm)	258	311	99

4.2.3 Caracterización de compósitos MgO y ZnO

En la figura 11 (a) se observa la morfología de compuesto de MgO y ZnO por el método de coprecipitación en las cuales podemos observar una mezcla de hojuelas y varillas en forma de prismas con una media de tamaño de partícula de 59 nm y una desviación estándar de 26 nm, como en tabla 6; mientras que en la

figura 11 (b) se observa la morfología de compuesto de hidróxido de magnesio y óxido de zinc por método hidrotérmico, podemos observar que se presenta una morfología de hojuelas, con una media de tamaño de partícula de 57 nm y una desviación estándar de 21 nm, que se ve en tabla 6.

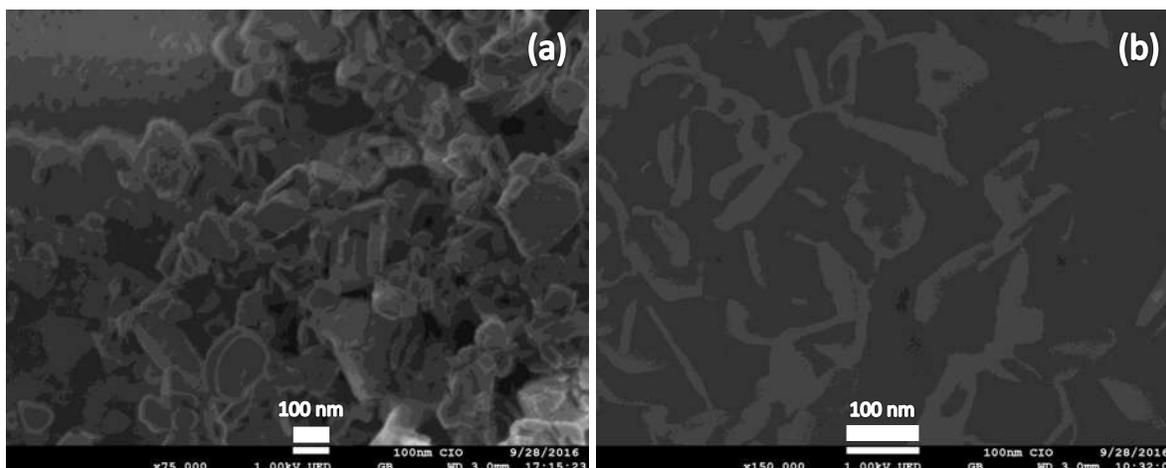


Figura 11. Imágenes de microscopía electrónica de barrido: (a) compósitos de MgO y ZnO por método de coprecipitación, (b) compósitos de ZnO y Mg(OH)₂ por método hidrotérmico.

A continuación se muestran los resultados de tamaño de partícula que fueron analizados con la ayuda del programa ImageJ.

Tabla 6. Resultados de tamaño de partícula de compósitos de ZnO / MgO y ZnO / Mg(OH)₂ obtenidos por coprecipitación

Fase	MgO / ZnO		Mg(OH) ₂ y ZnO
Método	Coprecipitación		Hidrotérmico
Temperatura, C	1000°	500°	
Parámetros			
Promedio (nm)	93	59	57
SD (nm)	36	26	21
Mín (nm)	35	19	14
Máx (nm)	163	159	112

4.3 Determinación del ancho de banda prohibido

La determinación del ancho de banda prohibida en materiales es importante para obtener las bases de la física de estado sólido. El ancho de banda indica la diferencia en energía entre la banda de valencia y la banda de conducción. El ancho de banda está relacionado con la conductividad eléctrica de los materiales. Generalmente no existe ancho de banda prohibido en materiales metálicos, mientras que para materiales aislantes existe un ancho de banda prohibido muy alto y para materiales semiconductores el ancho de banda prohibido se encuentra en un punto medio entre estos dos. El ancho de banda prohibido se determinó por reflectancia difusa ultravioleta visible, como se ve en la figura 12 a partir de las muestras de óxido de zinc y óxido de magnesio sintetizados por el método de coprecipitación los cuales se trata de materiales semiconductores.

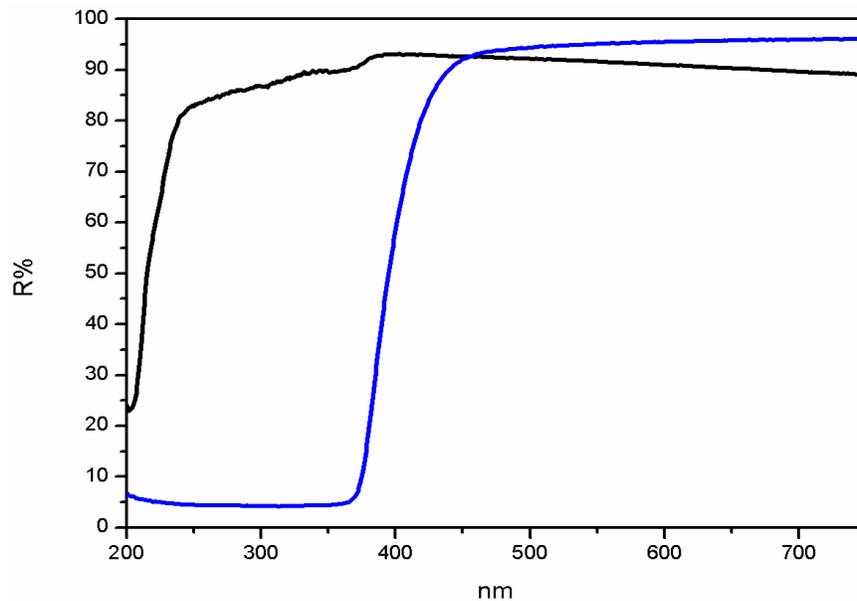


Figura 12. Reflectancia difusa (Negro: MgO, Azul: ZnO)

El óxido de zinc es un material semiconductor de ancho de banda prohibido de 3.2 a 3.4 eV (Wang, C.; Wang Z.; H. Zhang, 2003). El óxido de magnesio también es un material semiconductor con un ancho de banda prohibido de 5.8 a 5.96 eV (Nurhanna Badar, Nor Fadilah Chayed, 2012). A continuación se muestran los resultados del ancho de banda prohibido del óxido de magnesio y óxido de zinc figura 13 (a) y (b) respectivamente. Los anchos de banda prohibidos estimados fueron de 5.58 eV para óxido de magnesio y 3.25 eV para óxido de zinc. Los resultados de reflectancia difusa fueron convertidos mediante la ecuación (1) a energía en eV con la función Kubelka-Munk con una transición de banda directa de $n=1/2$, el eje de las ordenadas fue llevado a $F(R)$ el cual es proporcional al coeficiente de absorción. Una línea recta es trazada tangencialmente en la curva y el band gap evaluado es aquel donde la línea recta intersecta con el eje de la abscisa.

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad (1)$$

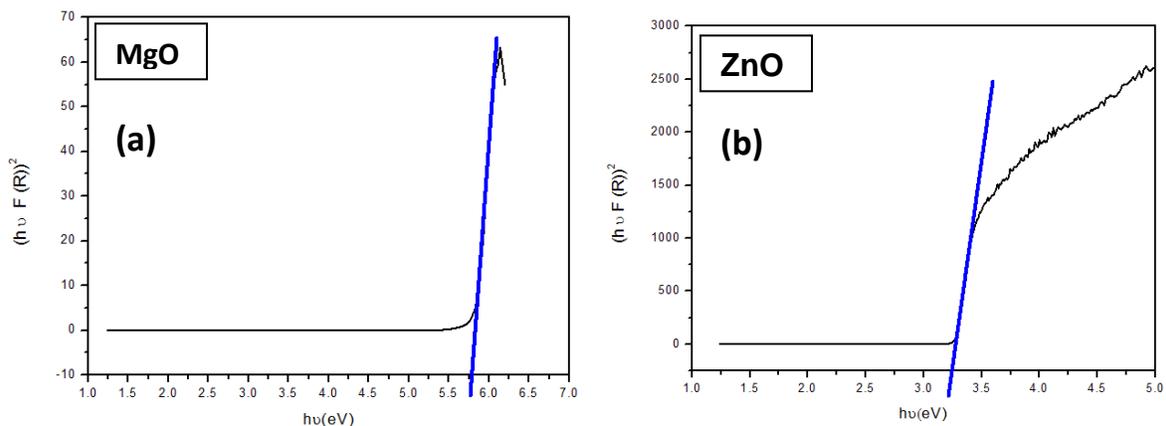


Figura 13. Ancho de banda prohibido de: (a) MgO, (b) ZnO

4.4 Análisis y pruebas de actividad antimicrobiana

4.4.1 Muestras de aguacate

Lugar: Tacámbaro, Michoacán.

Tipo de muestra: *Persea americana* “Hass”

Muestra: Hojas de la planta.

Diagnóstico: Visual.

Enfermedad: Antracnosis.

4.4.2 Muestras de papaya

El hongo *Colletotricum gloeosporioides* fue facilitado por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas, obtenidas de cosechas del estado de Campeche.

4.5 Actividad antifúngica de los nanomateriales sintetizados

Se partió aislando los distintos tipos de hongos que se encontraban en la planta afectada por antracnosis, para así identificar y aislar el hongo. Una vez aislado el hongo se prosiguió a su cultivo para poder alcanzar la concentración de esporas necesarias para nuestras pruebas, como muestran las manchas oscuras en la figura 14. Una vez alcanzada esta concentración se realizó la técnica de concentración mínima inhibitoria descrita en la sección experimental.



Figura 14. Hongo *colletotrichum Gloeosporioides* presente en hoja de aguacate.

En la figura 15 se observa una placa estéril de poliestireno con 96 pocillos, en los cuales se realizaron los experimentos por duplicado, observando en las filas de la A y B que corresponden al compuesto $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$ combinado con ZnO; se observó que de la muestra 1 a la 8 no se notó crecimiento de hongos y éste se presentó de la columna 9 a la 12. Las filas C y D corresponden a ZnO a $500^\circ C$. Las filas E y F corresponden a ZnO a $1000^\circ C$. En las muestras de óxido de zinc, no influyó la temperatura de sintetizado del material, ya que la presencia del hongo se presentó a partir de los pocillos 6 al 12. Posteriormente se dejó la fila G vacía y en la fila H se colocó el control que corresponde a la solución de dimetilsulfóxido con la siembra del hongo *colletotrichum gloeosporioides*; en la fila H creció el hongo en todos los pocillos, excepto que en los pocillos 10 a 12 de fila H se colocó dimetilsulfóxido estéril al no poseer hongo alguno, no presentándose crecimiento del hongo.

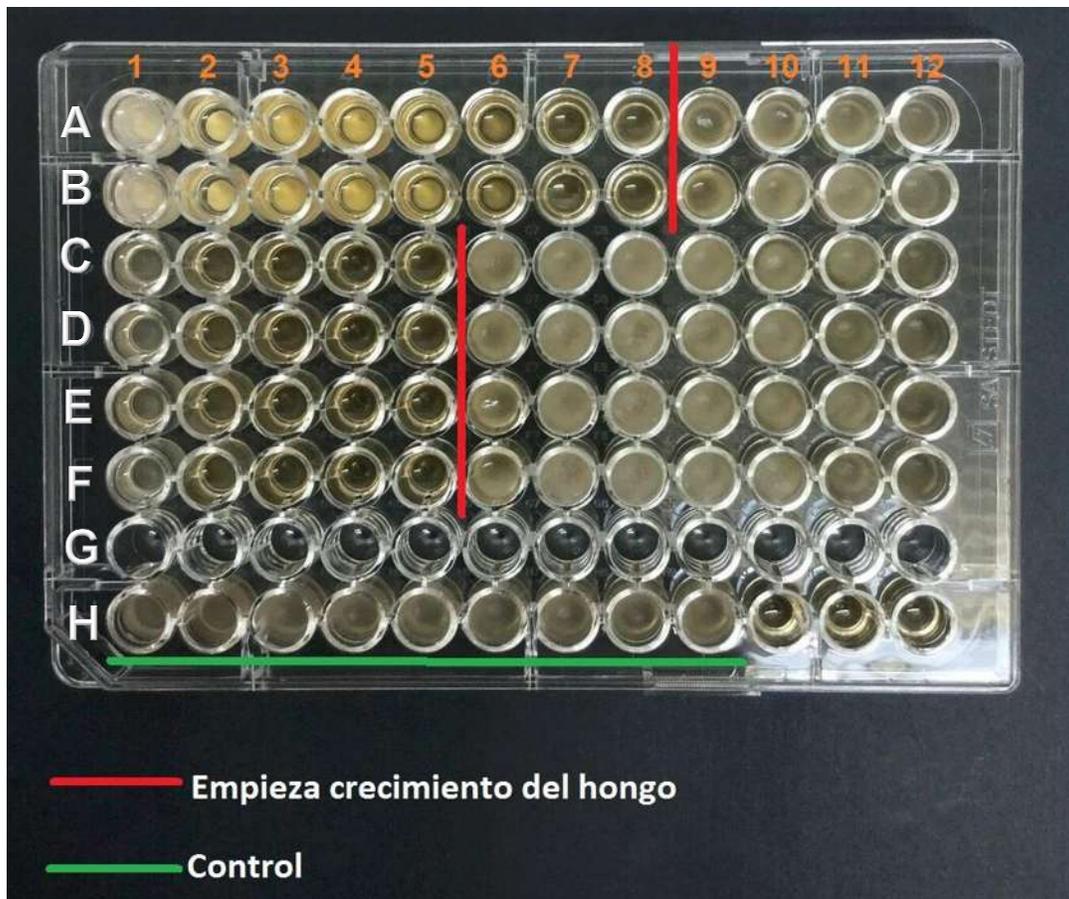


Figura 15. Prueba de concentración mínima de inhibición del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en crecimiento. Las filas corresponden a: A y B $Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$ y réplica; C y D, al ZnO calcinado a $500^\circ C$ y réplica; E y F al ZnO calcinado a $1000^\circ C$ y réplica; G vacío y H del pocillo 1 al 9 corresponden al control de la solución dimetilsulfóxido contaminado con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y del pocillo 10 al 12 solución con dimetilsulfóxido estéril.

En la tabla 7 se muestran las concentraciones empleadas en las pruebas de la actividad antifúngica de los compuestos sintetizados donde se inició con una concentración de 5 mg/ml diluyéndose al 50% por cada pozo desplazado a la derecha.

Tabla 7. Concentración en cada número de pozo de las microplacas.

Número de pozo	Concentración de nanomateriales, mg/ml
1	5
2	2.5
3	1.25
4	0.625
5	0.312
6	0.156
7	0.078
8	0.039
9	0.019
10	0.0097
11	0.0049
12	0.0024

A continuación, en la tabla 8 se muestran los resultados de las pruebas de concentración mínima de inhibición aplicadas al *Colletotrichum gloeosporioides* de la papaya. Como se observó en la figura 15, las dos diferentes temperaturas en el método de coprecipitación no tienen efecto alguno sobre la actividad antifúngica. El método de síntesis de coprecipitación es más eficiente comparado con el método hidrotérmico, salvo el caso donde se aplican 2 cocimientos por el método hidrotérmico.

Tabla 8. Resultados de concentración mínima de inhibición en papaya

Método de síntesis	Material	TMH, C	TMC, C	CMI mg/ml	CMF mg/ml	Modo de acción
Coprecipitación	$Zn_5(NO_3)_2(OH)_8 \cdot 2H_2O$	N/A	N/A	0.039	0.039	Fungicida
Coprecipitación	ZnO	N/A	1000°	0.156	0.156	Fungicida
Coprecipitación	ZnO	N/A	500°	0.156	0.156	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO	100°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO	160°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO	100-160°	N/A	0.078	0.078	Fungicida
Coprecipitación	$Mg(OH)_2$	N/A	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Coprecipitación	MgO	N/A	1000°	0.312	0.312	Fungicida
Coprecipitación	MgO	N/A	500°	0.625	0.625	Fungicida
Coprecipitación	$ZnO_{(0.5)}MgO_{(0.5)}$	N/A	1000°	0.312	0.312	Fungicida
Coprecipitación	$ZnO_{(0.5)}MgO_{(0.5)}$	N/A	500°	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	$ZnO_{(0.5)}Mg(OH)_{2(0.5)}$	100°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	$ZnO_{(0.5)}Mg(OH)_{2(0.5)}$	160°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	$ZnO_{(0.5)}Mg(OH)_{2(0.5)}$	100-160°	N/A	0.312	0.312	Fungicida

TMH= Temperatura por método hidrotérmico, C; TMC= Temperatura por método coprecipitación, C; CMI= Concentración mínima de inhibición; CMF= Concentración mínima de inhibición en réplica; Modo de acción: Fungicida/fungistático

En la tabla 9 de los resultados de *Colletotrichum gloeosporioides* del aguacate, se observó que el hongo, a pesar de ser el mismo, pero aislado de diferentes frutos, es más resistente el hongo presente en el aguacate que en la papaya y requiere de una mayor concentración de las nanopartículas para presentar el efecto fungicida.

Tabla 9. Resultados de concentración mínima de inhibición en aguacate

Método de síntesis	Material	TMH, C	TMC, C	CMI mg/ml	CMF mg/ml	Modo de acción
Coprecipitación	Zn ₅ (NO ₃) ₂ (OH) ₈ ·2H ₂ O	N/A	N/A	0.156	0.156	Fungicida
Coprecipitación	ZnO	N/A	1000°	0.312	0.312	Fungicida
Coprecipitación	ZnO	N/A	500°	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO	100°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO	160°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO	100-160°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Coprecipitación	Mg(OH) ₂	N/A	N/A	0.625	0.625	Fungicida
Coprecipitación	MgO	N/A	1000°	0.312	0.312	Fungicida
Coprecipitación	MgO	N/A	500°	0.625	0.625	Fungicida
Coprecipitación	ZnO _(0.5) MgO _(0.5)	N/A	1000°	0.625	0.625	Fungicida
Coprecipitación	ZnO _(0.5) MgO _(0.5)	N/A	500°	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO _(0.5) Mg(OH) _{2(0.5)}	100°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO _(0.5) Mg(OH) _{2(0.5)}	160°	N/A	0.312	0.312	Fungicida
Hidrotérmico	ZnO _(0.5) Mg(OH) _{2(0.5)}	100-160°	N/A	0.312	0.312	Fungicida

TMH= Temperatura por método hidrotérmico, C; TMC= Temperatura por método coprecipitación, C; CMI= Concentración mínima de inhibición; CMF= Concentración mínima de inhibición en réplica; Modo de acción: Fungicida/fungistático

En las tablas 8 y 9 se muestran los resultados de la concentración mínima a la cual tienen un efecto inhibitorio las partículas sintetizadas, notándose que todos los óxidos e hidróxidos de magnesio y zinc, así como también los compósitos de éstos, tienen actividad antifúngica ante el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* de aguacate y papaya. El hidróxido nitrato de zinc dihidratado es el compuesto con mayor actividad ante estos hongos. Resultó una mayor actividad en el *Colletotrichum gloeosporioides* de papaya con una concentración mínima inhibitoria de 0.069 mg/ml, mientras que para el *Colletotrichum gloeosporioides* de aguacate se tuvo una menor actividad con una concentración mínima inhibitoria de 0.156 mg/ml.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

5.1 Conclusiones

En el presente trabajo se ha llegado a varias conclusiones.

Respecto al método de síntesis, se concluye que el método con mejores resultados es el método de coprecipitación, debido a que se obtiene un tamaño de partícula más pequeño en los óxidos de magnesio y zinc e hidróxidos de magnesio, produciendo a un mejor efecto y actividad ante los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* de aguacate y papaya.

Se observó que en la síntesis por el método de coprecipitación el tamaño de partícula aumenta conforme su temperatura de calcinación es mayor, por lo tanto con una calcinación a 500° C los resultados en nanopartículas de tamaño nanométrico son menores, comparándolos con una calcinación a 1000° C. Por el método hidrotérmico, el tamaño también se ve afectado por la temperatura a la cual se realiza el tratamiento, por éste método se obtiene un tamaño de partícula más pequeño cuando es llevado hasta una temperatura de 160°C, mientras que con un tratamiento térmico de 100°C el tamaño de partícula es mayor, ambos métodos sometidos a un tiempo de tratamiento igual.

Basado en los resultados y pruebas realizadas, damos por concluido que los compuestos de zinc tienen un mayor efecto ante estos hongos y da mejores resultados que el magnesio ya que en los compuestos de zinc la concentración mínima de inhibición van desde 0.039 hasta 0.312 mg/ml mientras que los de magnesio van desde 0.312 hasta 0.625 mg/ml. El hidróxido de zinc no se obtuvo, en su lugar resultó una mezcla de zincita con hidróxido nitrato de zinc dihidratado, este compuesto se ha reportado que es un material estable en el intervalo de pH

de 5 a 9, en la cual no se observa una transformación de fase (Li et al., 2012). Esta mezcla resultó más activa y más eficiente para la inhibición del hongo, la cual la pone como una opción con mejores resultados. Aunque no se puede asegurar que fue por el reactivo inicial, debido a que no se realizaron pruebas con éste en los hongos.

Los objetivos propuestos se cumplieron en su totalidad.

- Los materiales sintetizados se llevaron a cabo con éxito.
- Los compósitos de magnesio y zinc se sintetizaron con éxito, aunque se observó muy poca modificación en su actividad antifúngica respecto a las variaciones en las concentraciones propuestas en este objetivo, debido a que el magnesio frena la actividad antifúngica del zinc.
- La caracterización por los diferentes métodos propuestos se llevaron a cabo con éxito.
- El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* se logró aislar e inocular para llevarse a cabo las pruebas propuestas, esto con la ayuda de la Dra. Susana del Carmen De La Rosa García
- Se determinó una actividad antifúngica en todos los nanomateriales en las pruebas que se llevaron a cabo,
- Se determinó la concentración mínima de inhibición en cada uno de los nanomateriales.

5.2 Trabajos a futuro

Se tiene como objetivo continuar trabajando con este proyecto para mejorar las síntesis de las nanopartículas de los diferentes métodos empleados, obteniendo tamaños de partícula más pequeños y con esto mejorar su actividad con el *Colletotrichum gloeosporioides*, así como también evaluar la actividad antifúngica de estos materiales en distintos hongos, también causantes de la antracnosis. También se propone probar los nanomateriales de zinc y magnesio con hongos causantes de antracnosis en otras plantas.

Realizar mayor investigación sobre otros métodos de síntesis para lograr mejores resultados en los compósitos de magnesio y zinc.

REFERENCIAS

- A. Corral-Aguado, P. Martínez-Torres, N. Gomez-Ortiz, J. Pichardo-Molina, Susana De la Rosa- García, S. E. B.-G. and A. M. (2016). Synthesis of Mg doped ZnO with hexagonal shape by hydrothermal method, 22(Suppl 3), 1882–1883. <https://doi.org/10.1017/S1431927616010254>
- Bogantes, A., Mora, E., Umaña, G., & Loria, C. (2010). Guia para la produccion de la papaya en costa rica, 1–53.
- Li, P., Xu, Z. P., Hampton, M. A., Vu, D. T., Huang, L., Rudolph, V., & Nguyen, A. V. (2012). Control preparation of zinc hydroxide nitrate nanocrystals and examination of the chemical and structural stability. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(18), 10325–10332. <https://doi.org/10.1021/jp300045u>
- Lira-Saldivar, Ricardo-Hugo, C.-F. (2015). ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y ÓXIDO DE ZINC-PLATA CONTRA Botrytis cinerea. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 1. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lira-Saldivar, R. H., Hernández-Suárez, M., & Corrales-Flores, J. (2014). Nanotecnología en agricultura sustentable. *Centro de Investigación En Química Aplicada*, 44. Retrieved from <http://www.fan.org.ar/wp-content/uploads/2014/05/Nanotecnologia-y-agricultura-sustentable.pdf>
- Morales, J., Azpíroz, H., & Pedraza, M. (2009). Colletotrichum gloeosporioides Penz ., causante de la antracnosis del aguacate (Persea americana Mill .) en Michoacán , México. *Revista UDO Agrícola.*, 9(4), 848–856.
- Palacio, F. (1998). Nanomaeriales.
- Peter G. von Carlowitz, G. V. W. and K. (1991). Carica papaya Carica papaya, (1753), 96–99.
- Rai, M., & Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 94(2), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3969-4>

Rodríguez, F. D. D. C. (2012). Introducción a los nanomateriales. *Lecturas de Ingeniería* 20, 79. Retrieved from [http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/Introduccion a los nanomateriales.pdf](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/Introduccion%20a%20los%20nanomateriales.pdf)

Tamilselvi, P., Yellilarasi, A., Hema, M., & Anbarasan, R. (2013). Synthesis of hierarchical structured MgO by sol-gel method. *Nano Bulletin*, 2(1), 130106.

Williams, D. (Scenih). (2006). The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. *Toxicology*, 246(2–3), 79. <https://doi.org/10.1016/j.toxic.2006.03.006> March 2006

A. Bisggs, C. Kapicka , L. Lundgren; *Biología, La dinámica de la vida*, México Mc Graw Hill, 2000

Bisby F., Y Roskov, T Orrell, D. Nickolson, L. Paglinawan, N. Bailly, P. Kirk, T. Bourgoïn, J. Hertum. *Catalogue of life* 2008.

Maine, E., Thomas V.J., Bliemel, M, Murira, A, Utterback, J. 2013. The emergence of the nanobiotechnology industry. *Nat Nanotechnol.*

Edgar Saúl Rodríguez–López, Juan Manuel González–Prieto y Netzahualcoyotl Mayek–Pérez. Infection of avocado (*Persea americana* Mill.) by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.: Biochemical and genetics aspects. *Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, Tamaulipas, México.*

Fajardo, L. R.; Freire, M. S.; García, Y. R. y Argentel, L. M. Formación de embriones somáticos en *Persea americana* Mill var. Catalina a partir de embriones cigóticos inmaduros. *Biotecnología Vegetal*, 2005, vol. 5, no. 2, pp. 103-107.

G. Guzman, La diversidad de los hongos en México. Ciencias 39:52-57.

Monografía de cultivos. Aguacate. Subsecretaria de Fomento de Agronegocios, 2011, pp. 1-10.

E. Rodríguez, J. Gonzáles, N. Mayek; Infection of avocado *Persea americana Mill* by *colletotrichum gloeosporioides* biochemical and genetics aspects. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa Tamaulipas, 2008

Rodríguez, A. N. y Sánchez, P. P. Especies de frutales cultivadas en Cuba en la Agricultura Urbana. 3ra Edición, La Habana 2005.

Charles P. Poole, Frank J. Owens. Introduction to nanotechnology. Wiley Interscience, Canada 2003.

Nurhanna Badar, Nor Fadilah Chayed, Roshidah Rusdi, Norashikin Kamarudin, Norlida Kamarulzaman. *Band gap energies of magnesium oxide nanomaterials synthesized by the sol-gel method*. Universiti Teknologi MARA, Malaysia 2012

Wang, C, Wang Z.; Zhang, H.; Zhang, L.; Yuan, J.; yan, S.; *Nanotechnology* 2003, 14,11-15.

http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm

http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/hongos/hongos.html

Laboratorio de técnicas espectroscópicas, Universidad Rey Juan Carlos; técnicas espectroscópicas; 2013.