



**MCIAM**  
Maestría en Ciencias  
en Ingeniería Ambiental  
UMSNH

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

**AGENTES BIOCIDAS A PARTIR DE MATERIALES HÍBRIDOS A BASE DE  
ZnAl-TIMOL COMO FUNGICIDAS ECOLÓGICOS**

TESIS QUE PRESENTA

**Q.F.B. DIEGO VACA TOLEDO**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ASESORES

D. EN C. ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

M. EN C. ALEJANDRA SANTANA CRUZ

MORELIA, MICHOACÁN

NOVIEMBRE 2021

## Agradecimientos

Como dice el refrán, "es de bien nacidos ser agradecidos". Un agradecimiento a las instituciones que hacen posible este tipo de investigaciones científicas como es el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) que ha sido mi hogar en el ámbito profesional y específicamente a la Facultad de Ingeniería Ambiental, a los laboratorios de investigación de Químicas Biológicas, donde pude llevar a cabo mis investigaciones experimentales un agradecimiento a la universidad que colabora en esta investigación la Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco (UAM Azcapotzalco), desde luego un agradecimiento al Doctor Roberto Guerra quien ha sido mi asesor de tesis apoyando en todo momento en este trabajo, un agradecimiento especial a mi coasesora de tesis la maestra en ciencias Alejandra Santana Cruz, quien ha ido de la mano despejando las dudas que han surgido en el trayecto de la investigación brindando un gran apoyo. Un agradecimiento a mi mesa evaluadora que siempre han brindado el apoyo necesario para desarrollar la tesis de manera eficaz, un agradecimiento a compañeros de posgrado y, por último, pero no menos importante un agradecimiento al pueblo de México que son ellos quien por medio de sus impuestos hacen que la ciencia y tecnología siga avanzando. Muchas gracias.

# Índice general

Índice de figuras.....	5
Índice de tablas .....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	8
1 Introducción.....	9
1.1 Retos para conservar el medio ambiente y la seguridad alimentaria .....	9
2 Marco teórico.....	13
2.1 Hidróxidos dobles laminares (HDL).....	13
2.1.1 Estructura química, métodos de síntesis y características generales de los HDL	14
2.2 Materiales Híbridos .....	15
2.2.1 Rutas para obtener híbridos a base de HDL .....	16
2.3 Reino Fungi.....	18
2.3.1 Moho gris.....	19
2.3.2 Antracnosis.....	20
2.4 Fungicidas y cambio climático .....	20
2.4.1 Fungicidas y sus grupos.....	21
2.5 Aceites esenciales .....	22
2.5.1 Aplicaciones .....	22
3 Antecedentes.....	23
3.1 Estudios de base .....	24

4	Justificación e hipótesis.....	26
4.1	Justificación .....	26
4.2	Hipótesis .....	27
5	Objetivos.....	27
5.1	Objetivo general.....	27
5.2	Objetivos específicos .....	27
6	Desarrollo experimental.....	27
6.1	Síntesis de los hidróxidos dobles laminares .....	29
6.1.1	Ruta para óxidos mixtos .....	29
6.1.2	Ruta por hidrólisis de urea.....	30
6.2	Preparación de los materiales híbridos .....	30
6.2.1	Intercalación por intercambio iónico .....	30
6.2.2	Ruta de reconstrucción.....	32
6.3	Caracterización fisicoquímica de los materiales .....	33
6.3.1	Difracción de rayos-X (XRD) .....	33
6.3.2	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier .....	33
6.3.3	Análisis termogravimétrico .....	34
6.3.4	Microscopía electrónica de barrido.....	34
6.4	Evaluación de la actividad antifúngica .....	34
6.4.1	Material fitopatógeno .....	34
6.4.2	Pruebas in vitro ante <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	34
6.4.3	Pruebas in vitro contra <i>Botritis cinérea</i> .....	36

6.4.4	Evaluación de la actividad antifúngica in vivo.....	37
6.5	Análisis de conservación de timol mediante HPLC .....	38
7	Análisis y discusión de resultados .....	39
7.1	Datos fisicoquímicos de los materiales .....	39
7.1.1	Estructura cristalina .....	39
7.1.2	Espectroscopía IR característica de los HDL .....	43
7.1.3	Termogramas característicos de los HDL .....	48
7.1.4	Análisis de la morfología del material híbrido <i>HDL-T</i> .....	50
7.2	Actividad antifúngica .....	53
7.2.1	Pruebas in vitro contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	53
7.2.2	Pruebas in vitro contra <i>Botritis Cinérea</i> .....	57
7.2.3	<i>Botritis</i> contra fresas, híbrido contra <i>Botritis</i> .....	59
7.3	Análisis de conservación de timol .....	63
7.3.1	Conservación- descomposición de timol .....	63
8	Conclusiones .....	64
9	Referencias .....	65
10	Anexos .....	74
10.1	Lugar de elaboración .....	74

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de la brucita .....	14
<b>Figura 2.</b> Estructura de un HDL.....	14
<b>Figura 3.</b> Hifas y esporas didácticas.....	19
<b>Figura 4.</b> HDL – 0 después de tratamiento térmico .....	30
<b>Figura 5.</b> Sistema montado para la reacción de intercalación e intercambio iónico	31
<b>Figura 6.</b> Esquema de la des-protonación del timol .....	31
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo de ecuaciones químicas del intercambio iónico .....	32
<b>Figura 8.</b> Material híbrido después de secado.....	32
<b>Figura 9.</b> Esquema representativo de ecuaciones en el proceso de reconstrucción .....	32
<b>Figura 10.</b> Cepa de Botritis cinérea para su raspado .....	38
<b>Figura 11.</b> Sistema para las pruebas in vivo contra Botritis cinérea en fresas .....	38
<b>Figura 12.</b> Gráfica de los espectros de difracción de rayos X típicos de HDL.....	40
<b>Figura 13.</b> Representacion de la distancia del plano 003 con el cual se obtiene la distancia interlaminar (Santana, 2014).....	40
<b>Figura 14.</b> La intensidad del pico con el plano 110 del gráfico es indicativo de la formación de óxidos mixtos o material ZnO/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Miao et al., 2009).....	41
<b>Figura 15.</b> Gráfica del difractograma correspondiente al espectro de difracción de rayos X del material HDL-NO <sub>3</sub> .....	42
<b>Figura 16.</b> Gráfica de los difractogramas de los materiales híbridos.....	43

<b>Figura 17.</b> Gráfica correspondiente a los espectros IR característicos de HDL en contraste con intercalaciones de naranja de metilo. Fuente; (Ramírez Llamas et al., 2015).....	44
<b>Figura 18.</b> Gráfica representativa del espectro IR del material HDL(O), la banda más ancha de absorción en la región de 500 a 600 $\text{cm}^{-1}$ corresponde a las vibraciones de los enlaces metálicos $\text{ZnO}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (Kloprogge et al., 2004).....	45
<b>Figura 19.</b> Gráfica correspondiente al espectro de IR del material HDL- $\text{NO}_3$ .....	46
<b>Figura 20.</b> Gráfica correspondiente al espectro IR de los materiales híbridos sintetizados por la ruta de reconstrucción partiendo de combustión de un HDL en contraste con los espectros de timol y tomillo. ....	47
<b>Figura 21.</b> Gráfica de los espectros IR correspondientes a los híbridos obtenidos por la ruta de intercambio iónico en comparativa con los espectros del timol y el extracto de tomillo.....	47
<b>Figura 22.</b> Gráfica de los termogramas característicos de distintos HDL, se aprecia la pérdida de agua en el evento de 100 a 200 $^{\circ}\text{C}$ , la demás pérdida de peso corresponde a la descomposición laminar y rompimiento de enlaces metálicos. Fuente; (Fernández, 2016).....	49
<b>Figura 23.</b> Gráfica del análisis TGA para el material HDL-(O), mostrando pérdidas totales de masa cercano al 10% en su descomposición debido a la temperatura. ....	49
<b>Figura 24.</b> Gráfica del análisis TGA correspondiente al híbrido HDL-T.....	50
<b>Figura 25.</b> Morfología del material HDTL-T a x5,000 derivado de la ruta de reconstrucción, aglomeraciones cristalinas.....	51
<b>Figura 26.</b> Morfología del material HDTL-T a x10,000 derivado de la ruta de reconstrucción.....	51
<b>Figura 27.</b> Morfología del material HDTL-T a 20,000 derivado de la ruta de reconstrucción, grandes láminas cristalinas, regiones grisáceas.....	52
<b>Figura 28.</b> Morfología del material HDTL-T a x30,000 derivado de la ruta de reconstrucción, se alcanzan a observar los planos de las láminas cristalinas. ....	52
<b>Figura 29.</b> Análisis elemental del HDL-T obtenido por la ruta de reconstrucción. ...	53

<b>Figura 30.</b> Gráfica representativa de la inhibición de los materiales híbridos derivados de la reconstrucción de la combustión contra <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> . .....	55
<b>Figura 31.</b> Gráfica representativa en la inhibición del hongo <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> ante los materiales híbridos obtenidos de la ruta de intercambio iónico en contraste con el híbrido obtenido de la reconstrucción. ....	56
<b>Figura 32.</b> Efecto fungistático de los materiales contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . .....	57
<b>Figura 33.</b> Gráfica representativa de la inhibición del hongo <i>Botritis cinérea</i> ante los materiales.....	58
<b>Figura 34.</b> Inhibición de <i>Botritis cinérea</i> accionando en fresas bañadas con solución del material híbrido y timol puro. ....	60
<b>Figura 35.</b> Efecto de la pudrición interna de fresas debido al hongo <i>Botritis cinérea</i> . .....	61
<b>Figura 36.</b> Gráfica de las áreas dañadas por la descomposición interna en las fresas debido al hongo <i>Botritis Cinérea</i> , las fresas tratadas a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ tuvieron un promedio menor de descomposición interna.....	62
<b>Figura 37.</b> Representación de las pruebas en pozos Petro para el análisis en HPLC. ....	63

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Fungicidas más usados (Botello, 2005, Pg. 191-198).....	21
<b>Tabla 2.</b> Antecedentes de híbridos y extractos esenciales .....	24
<b>Tabla 3.</b> Preparación de las cajas Petri y las concentraciones diluidas de los materiales.....	35
<b>Tabla 4.</b> Diluciones de los distintos materiales para los experimentos in vitro.....	36
<b>Tabla 5.</b> Inhibición de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por el material híbrido proveniente del método reconstrucción.....	54

<b>Tabla 6.</b> Inhibición del crecimiento radial de <i>Botritis cinérea</i> por la acción de los materiales.....	58
<b>Tabla 7.</b> Inhibición del daño interno en fresas por <i>Botritis cinérea</i> debido a la acción de los materiales. ....	62
<b>Tabla 8.</b> Disminución del area bajo la curva (cm <sup>2</sup> ) en el análisis HPLC a los tres distintos tiempos (T) 0, 72 y 120 horas y el % de perdida de timol. ....	64

## Resumen

En este trabajo se presenta la preparación de distintos materiales híbridos a base de hidróxidos dobles laminares HDL con cationes *MgAl* y *ZnAl* como parte de su estructura básica e impregnados de timol o tomillo formándose un híbrido con actividad fungistática comprobando este efecto en pruebas biológicas in vitro y vivo contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botritis cinérea* respectivamente. La estructura de los materiales fueron corroborados mediante análisis de caracterización fisicoquímica como; espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, difracción de rayos X y microscopia electrónica de barrido, adicionando un análisis del comportamiento de estos materiales frente a la temperatura con un análisis termogravimétrico y concluyendo con un estudio de conservación del principio activo timol en la matriz HDL mediante el cambio en el área bajo la curva de los picos de absorción UV del timol en una cromatografía de líquidos HPLC.

**Palabras clave:** *Botritis cinérea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Fungistático, Hidróxido doble laminar, Timol.

## Abstract

In this work, the preparation of different hybrid materials based on LDH layered double hydroxides with cations *MgAl* and *ZnAl* as part of their basic structure and impregnated with thymol or thyme will be presented, forming a hybrid with fungistatic activity, verifying this effect in biological tests in vitro and alive against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botritis cinerea* respectively. The structure of the materials was corroborated by physicochemical characterization analysis such as; Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction and scanning electron microscopy, adding an analysis of the behavior of these materials against temperature with a thermogravimetric analysis and concluding with a study of conservation of the

active principle thymol in the HDL matrix by changing the area under the curve of thymol UV absorption peaks in high performance liquid chromatography HPLC.

## 1 Introducción

### 1.1 Retos para conservar el medio ambiente y la seguridad alimentaria

La naturaleza al igual que la materia no se crea ni se destruye solo se transforma, de tal manera que la transformación de la naturaleza nos preocupa.

En la era agrícola, los humanos experimentaron la globalización gracias al desarrollo de materiales que potencializaron el sector agrícola. No obstante, la agricultura de aquel tiempo era un arduo trabajo debido principalmente a los grandes cuidados que se requerían para mitigar o aminorar problemas tales como, sequías, plagas e inundaciones (Harari, 2014), y además sumándole de contar con poca tecnología y desarrollo científico-industrial en aquel tiempo. A pesar de que se tenían pocos avances en aras de la ciencia e industria, con el tiempo lograron el desarrollo y descubrimiento de sustancias que ayudaban a controlar plagas, (hongos e insectos principalmente), sustancias de origen natural.

Actualmente, hay países que desarrollan los llamados bancos de semillas, estos bancos están siendo construidos en climas muy fríos, tal es el caso de la cámara global de semillas de Svalbard situado en el océano glacial Ártico, conocido como la cámara del fin del mundo, se inauguró en 2008 con el objetivo de tener reservas y recursos científicos para extraer nuevas características genéticas de los principales granos que alimentan a la humanidad y paliar los estragos del cambio climático que se presentaran en el futuro cercano y poder producir alimentos a pesar de sequías, inundaciones y plagas (James Bridle, 2020).

Se dice que el ejército norte americano está desarrollando una estrategia de sobrevivencia a las catástrofes ambientales que sin marcha atrás vendrán y están a la vuelta de la esquina. Los modelos matemáticos son bastante precisos y con base en ellos se sabe que el planeta sufrirá cambios derivados de la alteración climática, pero esto hará que evolucionemos como seres pensantes no solo en la forma de pensar y actuar, sino también en el desarrollo tecnológico, científico y de materiales que nos ayuden a generar un equilibrio ecológico, así como la crisis derivada por el COVID-19 que hizo exponencial la evolución tecnológica en el uso virtual de la misma, la crisis ambiental hará exponencial el uso de materiales que salvaguarden el medio ambiente.

Aunque la era agraria ha pasado desde hace bastantes años, aún es la base de nuestra alimentación, aún se siguen desarrollando mecanismos que generen más producción y abastezcan el crecimiento exponencial humano, pero muchas prácticas

en muchos países aún no están en equilibrio con el medio ambiente y tampoco cumplen requisitos sanitarios viables. Países del viejo continente y países como Estados Unidos de Norteamérica y Canadá se toman más en serio la prohibición de agroquímicos que dañan el ambiente y la salud humana, así como el desarrollo de agroquímicos ecológicos y prácticas agroecológicas.

La FDA (Food and Drug Administration), organismo creado en EE. UU., que regula medicamentos, alimentos y los procedimientos de producción de estos, ya está implementando proyectos para la producción de alimentos libres de contaminantes la seguridad alimentaria no solo abarca el cuidado del ambiente sino también el cuidado de la salud (Food & Beverages, 2021). El reto para el gobierno de México es ponerse al tanto de los avances en estos rubros para implementar en conjunto mecanismos que nos evolucionen como sociedad, el reto para la sociedad mexicana es informarse de todos los avances tecnológicos y científicos en las buenas prácticas agrícolas o agroecológicas y el reto para nosotros los estudiantes y científicos es coadyuvar en el desarrollo de materiales, tecnología, ciencia y divulgar las innovaciones para así mismo ir aislando las prácticas convencionales agrícolas y adquiriendo prácticas agroecológicas que salvaguarden el medio ambiente y la soberanía alimentaria de México.

En los últimos años, ha aumentado la preocupación en la sociedad en el rubro de la contaminación del aire, suelos y agua. A causa de esto, las investigaciones actuales se están centrando en encontrar formas de vida más eficaces, estrategias económicas y desarrollo de materiales y tecnologías que ayuden a la mejora de dichas problemáticas ambientales por medio del cambio en las prácticas humanas, la agroecología en los campos es una de esas transiciones en las prácticas humanas agrícolas, se podría decir que está siendo una disciplina científica, práctica agrícola, social y de igual suerte, impulso político, ya que el cambio climático lo demanda (Wezel et al., 2009).

El desarrollo de materiales amigables con el medio ambiente y de bajo costo económico, es un tema muy amplio para los investigadores que se dedican a dicha área, hay una amplia gama para elegir y contribuir al desarrollo de algún material que brinde nobles beneficios a cierto sector social y ambiental. En el sector agrícola el desarrollo de agroquímicos que sean amigables con el ambiente no solo está siendo impulsado por la ciencia y la industria, sino también como políticas gubernamentales que viene avanzando a nivel internacional (Calle Collado et al., 2013; Sabourin & Patrouilleau, 2017).

Por otro lado, hay numerosas investigaciones (como se estará revisando en el marco teórico) para el uso de fungicidas amigables con el ambiente y no nocivas a la salud humana, siendo estos una parte importante en todo el sector de productos agrícolas.

No obstante, es necesario el desarrollo de materiales que hagan más eficaces y accesibles el uso de ciertos fungicidas ecológicos para obtener un control biológico más eficaz y dejar de lado el uso de fungicidas convencionales y altamente peligrosos al ambiente, para diversas especies y así mismo, para el humano.

Igualmente, se comienza a utilizar el término biopreparado que abarca un programa completo en la agricultura, estos incluyen biofungicidas, bioinsecticidas, biofertilizantes y además una estructura cultural de prácticas bien definidas en el manejo agrícola, la formulación de compuestos químicos light son otro ejemplo del avance y esfuerzo que se están haciendo para mitigar problemas ambientales de modo que la relación de universidades y empresas se hace presente (FAO, 2010; Godoy et al., 2013).

Mencionándose todo esto, se puede analizar que el sector agrícola es un muy buen sector para el desarrollo de materiales que brinden características del cuidado al medio ambiente, desde luego que el sector agrícola es un sector muy vasto de tal manera que es importante identificar las áreas más esenciales o con mayor demanda de desarrollo ambiental-económico y una de estas es el control de hongos fitopatógenos ya que representan un problema muy grande en la agricultura y trae consigo problemas sanitarios y de deterioro ambiental.

Dentro de los hongos fitopatógenos más nombrados en el sector agrícola son *Botrytis cinérea* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Dean et al., 2012; Juárez et al., 2010), siendo estas dos cepas de las más involucradas en problemas agrícolas que conllevan a pérdidas económicas, contaminación y problemas sanitarios. La antracnosis es una anomalía ampliamente estudiada y que deriva principalmente del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* causando pérdidas no solo económicas sino también biológicas (Huerta et al., 2009). Esta enfermedad es muy común en frutos tales como mango, aguacate, fresas, donde su desarrollo depende mucho de climas húmedos y calurosos, por otra parte, *Botrytis cinérea*, conocido como moho gris es muy común en cultivos de fresa y al igual que su homólogo *Colletotrichum gloeosporioides* se desarrolla en condiciones con alta humedad.

En el estado de Michoacán se considera con orgullo el cultivo de frutas y hortalizas, especialmente la producción de aguacate y frutos del bosque que tienen un alto valor socioeconómico, siendo una gran fuente de ingresos económicos para el estado debido a las exportaciones que se realizan y que cada año aumentan principalmente a Estados Unidos de Norte América. (Alfaro-Espino et al., 2017). Sin embargo, la agricultura en estos sectores trae consigo prácticas como el uso de agroquímicos tóxicos que contaminan el ambiente y causan riesgo sanitario. Los agroquímicos abarcan muchos rubros, dentro de ellos es el uso de fungicidas para control de plagas derivadas de hongos fitopatógenos en huertas. Estos problemas no solo arrastran una degeneración

al medio ambiente, sino también una pérdida económica y la necesidad de inversiones aplicables para el control de diversas plagas siendo más común el ya mencionado (*Colletotrichum gloeosporioides*). De la misma manera, según la Editorial Agro Cultivos S.C.de R.L. de C.V. en el estado de Michoacán se encuentra muy desarrollada la industria de los frutos del bosque siendo el municipio de Zamora quien lidera este sector poniendo a México como uno de los principales exportadores a nivel mundial teniendo EE.UU. como el principal consumidor, pero que inclusive ya los mercados chinos se están abriendo al consumo de frutos del bosque. Es un factor de buen impacto económico y que de la misma manera tienen el reto de controlar problemas por plagas, siendo el moho gris causado por *Botrytis cinérea* el principal, sumándole el problema que éste es un hongo que tiene la capacidad de generar resistencia a fungicidas con relativa facilidad.

A su vez, han investigado cierta variedad de aceites esenciales que han mostrado amplia actividad antifúngica, según la literatura en el desarrollo de fungicidas ecológicos son el timol y el linalol, los compuestos químicos de extractos esenciales con mayor potencia antifúngica y antibacteriana. (Lemus-Soriano & Pérez-Aguilar, 2017). Sin embargo, la manipulación de extractos esenciales puede ser complicada debido a sus características fisicoquímicas de tal manera que los hace un poco difícil de manejar.

Por otra parte, el desarrollo de materiales que se acomplejen con moléculas orgánicas está abriendo una entrada a la revolución de materiales híbridos con características amigables al ambiente y de mayor eficacia, dentro de estos materiales podemos citar los basados en (HDL), control de *Escherichia coli* (Lobo-Sánchez et al., 2018; Santana-Cruz et al., 2016), alternativas de fertilizantes más eficaces derivados de HDL, (Bernardo et al., 2018). Aunque no hay aplicación en cuanto a la preparación de híbridos a base de HDL y moléculas derivadas de aceites esenciales tales como timol contra hongos fitopatógenos, sin embargo, han desarrollado híbridos basados en esto para mitigar problemas derivados de bacterias patógenas abriendo la puerta a la exploración y experimentación de estos HDL ahora en el sector agrícola y fitopatógeno.

Los HDL son unos de los materiales que comienzan a ser estudiados en este rubro como alternativas más amigables con el ambiente o como remediadores adsorbentes de metales pesados y herbicidas (Murgueitio et al., 2015), estos materiales pueden retener moléculas orgánicas o inorgánicas brindándoles ciertas características útiles para su manipulación y su conservación o extracción de moléculas no deseadas de ciertas áreas, encaminando fuertemente las investigaciones de los HDL o híbridos derivados de HDL a innovadores materiales que entran como parte de las nuevas tecnologías de materiales en las prácticas humanas. Y esto debido a las características que los HDL tienen como parte de su estructura y de sus virtudes como materiales químicos, tales como capacidad de intercambio iónico (Fernández, 2016), capacidad

de reconstruirse o efecto memoria (Costantino et al., 1998), por mencionar algunos y además no son nocivos para la salud ambiental ni humana. El desarrollo de materiales híbridos está siendo el nuevo oleaje de innovación donde los HDL entran como parte de ello.

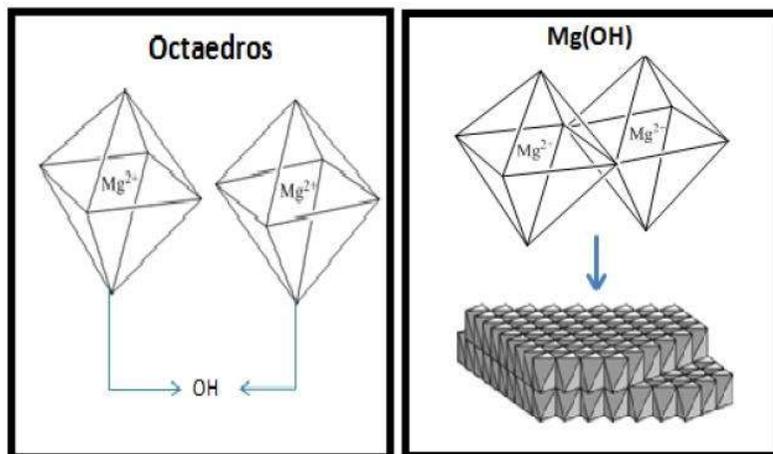
## 2 Marco teórico

### 2.1 Hidróxidos dobles laminares (HDL)

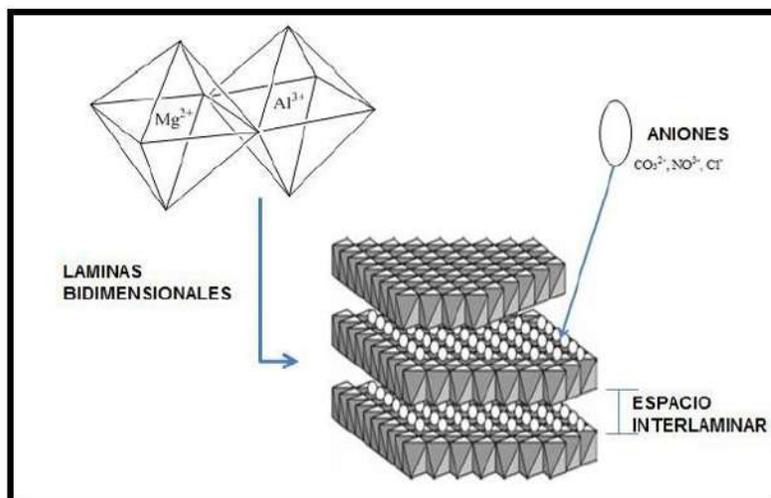
Los hidróxidos dobles laminares (HDL) son matrices laminares biocompatibles que tienen una estructura general;  $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2(A^{n-})_{n/x}] \cdot H_2O$ , (Miyata, 1975) donde  $M^{II}$  y  $M^{III}$  son cationes divalentes y trivalentes respectivamente,  $A^{n-}$  es el anión que reside en la región interlaminar, los aniones situados en la región interlaminar son móviles y pueden intercambiarse por moléculas de naturaleza distinta algo así como osmosis sintética, de tal manera que se aprovecha esta característica para introducir aniones orgánicos, inorgánicos o biomoléculas. La estructura cristalina de los HDL deriva de la estructura laminar de la brucita,  $Mg(OH)_2$ , en la cual el catión  $Mg^{2+}$  se encuentra coordinado octaédricamente a seis grupos hidroxilo. Cuando en la brucita algunos cationes  $Mg^{2+}$  se sustituyen por cationes trivalentes con radios iónicos similares, como el  $Al^{3+}$ , se origina un residuo de carga positiva en la lámina, esta carga total positiva se compensa por aniones como  $CO_3^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ , etc., los cuales se posicionan en la región interlaminar, en donde también se encuentran moléculas de agua de cristalización. Otra propiedad para este tipo de materiales es su alta área superficial específica (100-300  $m^2/g$ ). y la más importante para fines del presente trabajo, es su capacidad elevada de intercambio aniónico (Fernández, 2016), además de su capacidad de impregnar moléculas. Pero, los cationes divalente y trivalente pueden ser diferentes al  $Mg^{2+}$  y  $Al^{3+}$ , por ejemplo,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , etc. Y  $Fe^{3+}$ ,  $In^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ , etc. El distinto radio atómico le confiere a los HDL una estructura diferente para cada caso, además que dependiendo del peso molecular de los átomos también modifica su arreglo octaédrico molecular (Martínez & Carbajal, 2012). De tal manera que los cationes más empleados en la investigación son  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , desde luego que depende del enfoque científico o de su utilidad o valor agregado que se le vaya a dar.

## 2.1.1 Estructura química, métodos de síntesis y características generales de los HDL

Ya que estos materiales derivan de la brucita, se pueden visualizar a partir de ella. **Figura 1** y **Figura 2** (Santana, 2014).



**Figura 1.** Estructura de la brucita



**Figura 2.** Estructura de un HDL

En la **Figura 2** representando un HD se puede observar láminas que albergan los aniones, brindándoles protección de su descomposición o interacción con el ambiente. El tamaño basal del espesor de la brucita es de 0.48 nm (Martínez & Carbajal, 2012). De tal manera que el aumento en su espesor está directamente relacionado con la

formación de un HDL y dependiendo del tamaño de la molécula aniónica será el tamaño del espesor del HDL.

Los HDL han ido teniendo mayor impacto en la industria y en la investigación en los últimos años debido a su fácil y económica síntesis además de su gran beneficio en diversos sectores, tales como farmacia, alimenticia, genética, médica, agrícola, eliminación de contaminantes (Bernardo et al., 2018; Fernández, 2016; Mendoza Damián, 2017) entre otras aplicaciones más.

Hay diversos métodos para la síntesis de los HDL y todos brindan distintas características en los materiales dependiendo del enfoque que se le dé en la investigación, por ejemplo han utilizado el método sol-gel con irradiación de microondas para obtener un HDL capaz de remover cromo y remediar suelos además con objetivo de buscar una constitución de partículas pequeñas (Mexicana et al., 2015; Ramos et al., 1997), (P. Benito et al., 2009), otro método es por irradiación de microondas buscando un tamaño menor en cristales y acotar el tiempo de cristalización (Fetter et al., 1997), también está el método por hidrólisis de urea que busca alta cristalización y buena propiedad de efecto memoria (Costantino et al., 1998) y, el método de emulsión en solución con variaciones de pH donde se busca una área superficial amplia (He et al., 2004), sin embargo, los métodos más empleados son los basados en la precipitación de sales tales como el método de coprecipitación a baja y alta sobresaturación, método económico y práctico. Para fines de este trabajo se optó por el método o ruta de hidrólisis de urea para el desarrollo de los distintos HDL (XueDuan, 2013) y por el método de combustión, un método más reciente en la investigación que deriva de una solución con un compuesto que ejerza combustión al aplicar temperatura, buscando obtener óxidos mixtos facilitando su homogeneización y una directa síntesis de los híbridos (Patil et al., 2002), este método puede ayudar en la eficacia de la intercalación o impregnación de los aniones o moléculas deseadas ya que al descomponer un HDL a óxidos mixtos todos sus aniones serán eliminados quedando libre la entrada en su reconstrucción para intercalar o absorber una nueva molécula sin necesidad de competir contra otros aniones, aunque este método o ruta de solución en combustión es dirigido para la formación de  $ZnO$  y  $AlO$  para distintas aplicaciones de remediación o como semiconductores por mencionar algunos (Rajeshwar & De Tacconi, 2009), se dirigió este método hacia los HDL con  $Zn$  y  $Al$  en su estructura.

## 2.2 Materiales Híbridos

A lo largo de la historia hemos ido descubriendo y desarrollando nuevos materiales que se han convertido en parte de nuestra evolución y nos apoyamos de ellos para la creación de todo tipo de cosas. Los materiales híbridos se pueden definir como compuestos con multicomponentes que tienen al menos un compuesto orgánico

biológico y uno inorgánico y que juega un papel importante la interfaz orgánico-inorgánico en energía y en reacción entre sí y, que como híbridos modifican sus propiedades ópticas, mecánicas, de separación, catálisis y su estabilidad a tensiones físicas y químicas (Faustini et al., 2018). La interacción de compuestos orgánicos-inorgánicos ha encaminado la Génesis de materiales híbridos con diversas aplicaciones, en el sector energético, biomedicina, genética, medio ambiente, tecnología de empaques y con mucha más prospección hacia el futuro donde las matrices inorgánicas le dan una funcionalidad aguda a los compuestos orgánicos (Faustini et al., 2018; Ruiz-Hitzky et al., 2010).

En los últimos años, los materiales híbridos a base de HDL han cobrado gran importancia en muchos campos industriales y de investigación. Estos materiales están constituidos por una parte orgánica y otra inorgánica como se mencionó anteriormente, en los cuales se combinan de manera homogénea moléculas orgánicas biológicamente activas con moléculas inorgánicas como *Zn* y *Al* (Oh et al., 2009). De manera particular, los sistemas basados en la asociación de moléculas funcionalizadas biológicamente y materiales inorgánicos bidimensionales biocompatibles han recibido gran atención en la última década. Entre los materiales bidimensionales sobre los cuales se ha centrado en gran medida el interés se encuentran los llamados hidróxidos dobles laminares (HDL). Teniendo un alto impacto en el desarrollo y evolución humana, estos abarcan una gama muy vasta en la investigación científica y con un gran interés en muchas áreas de las prácticas humanas; en la industria farmacéutica se comienza a estudiar la acción de híbridos a base de HDL como bactericidas que liberen el principio activo de forma controlada (Santana, 2014). En el sector de medio ambiente se encuentran los de remediación o como pesticidas ecológicos (Morales-Irigoyen et al., 2018).

### 2.2.1 Rutas para obtener híbridos a base de HDL

En la literatura existen distintos métodos mediante los cuales se puede llevar a cabo la intercalación o impregnación de distintas moléculas a los HDL. Estos métodos están basados en propiedades particulares inherentes a los HDL y dependiendo de las características fisicoquímicas de las moléculas a intercalar.

Hay diversos métodos para la obtención de un HDL, así como la de híbridos a base de estos, fuera de usar diversos métodos con objetivos diferidos, que limiten a un objetivo específico, los métodos que hay en la literatura fueron objeto de análisis y de contraste para la mejor opción a considerar el costo en capital, energía y en tiempo, dentro de estos métodos se pueden mencionar los más empleados en la literatura además de que se ajustan a los objetivos del presente trabajo.

### 2.2.1.1 Ruta de coprecipitación

Este método se basa de manera general en la adición de soluciones que contengan los cationes trivalentes y divalentes (nitratos de magnesio y nitratos de aluminio) y una segunda solución alcalina con el anión de interés, si no se agrega ningún anión los nitratos se intercalan en la región interlaminar (Aisawa et al., 2001). Es muy importante mantener un pH de 9 a 10, ya que en la literatura se considera el pH adecuado para la formación de los cristales.

Este método es el más convencional y el más eficaz para la síntesis de materiales (HDL y HDL-híbrido) ya que en la literatura lo marcan como el más viable para formar una buena cristalización a bajos costos (Shen et al., 1994).

### 2.2.1.2 Ruta de efecto memoria

Este método se basa en la propiedad de efecto memoria, o reconstrucción de su estructura en un HDL, este fenómeno se aprovecha para formar un híbrido con un anión orgánico deseable. Está basado en un proceso de destrucción/reconstrucción de la estructura laminar del HDL provocado por un tratamiento térmico generando sus óxidos mixtos de los metales puestos en tratamiento. Posteriormente al poner estos óxidos mixtos en contacto con una solución alcalina que contenga aniones de interés, este recobrará su estructura laminar original y en la región interlaminar residirán los aniones contenidos en la solución o en efecto los aniones o moléculas se impregnaran sobre el área superficial. Esta capacidad de los HDL de reconstruir la estructura laminar recibe el nombre de efecto memoria (Newman & Jones, 1998), a los 600 °C es la temperatura donde se observa el fenómeno de descomposición y formación de los óxidos mixtos, estos se llevan a una solución que contenga el anión de interés a un pH de igual manera de 9 a 10, al cabo de siete días el material híbrido está formado. Esta ruta es muy útil en la síntesis de híbridos con moléculas orgánicas de gran tamaño y peso molecular debido a una interacción más lenta comparada con aniones pequeños por las mismas características fisicoquímicas que difieren entre moléculas y sus tamaños.

### 2.2.1.3 Ruta de intercambio iónico

El intercambio iónico en realidad es una característica de los HDL que es aprovechada para cambiar los iones albergados en su región interlaminar por iones de interés, tomando en cuenta la afinidad que estos tienen; reportados por Miyata podemos saber el orden de algunos aniones por su afinidad a intercalarse ( $CO_3^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $OH^-$ ,  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $I^-$ ), (Miyata, 1983). Y para ciertos compuestos orgánicos; (Carboxilatos, fosfonatos, alquilsulfatos y benzoatos) y biomoléculas; (DNA, aminoácidos, vitaminas, péptidos y nucleósidos) (Mishra, Dash, & Pandey, 2018), por

esto es que en el área de nutrición y de biomedicina los HDL están teniendo una participación bien aceptada en la investigación y desarrollo.

Este método se basa en el intercambio iónico de las moléculas interlaminares y al igual que el efecto memoria, es útil en la síntesis de híbridos. Los aniones alojados en el espacio interlaminares se pueden intercambiar con relativa facilidad. Partiendo de un HDL con algún anión con poca afinidad, se coloca en una solución que contenga el anión deseado a un pH adecuado 9-10, logrando el desplazamiento del anión poco afín (Meyn et al., 1990 Costantino et al., 1999), la acción de una base regularmente  $NaOH$ , es la des protonación de las moléculas a intercalar. Por otra parte, al manipular el curso de formación de un HDL o de un híbrido es importante considerar las afinidades de las moléculas por la región interlaminares, importante colocar un exceso estequiométrico para garantizar la intercalación (Santana, 2014). Los aniones menos afines son los nitratos, he aquí uno de los motivos de la síntesis con las soluciones de nitratos, pero el anión más afín es el carbonato (Martínez & Carbajal, 2012; Miyata, 1975), la atmosfera contiene  $CO_2$  y este puede incrustarse como carbonatos de tal manera que evita la intercalación de cualquier molécula, por tal razón es necesaria una buena práctica en su síntesis generando una atmosfera inerte con algún gas noble, inclusive esta característica de capturar el  $CO_2$  de la atmosfera se ha vuelto importante en el desarrollo e investigación de filtros o materiales a base de HDL para capturar este contaminante atmosférico (Ram Reddy et al., 2006; Torreiro, 2018).

## 2.3 Reino Fungi

Los hongos son de suma importancia en la vida humana. A pesar de que son eucariotas, sus características morfológicas y bioquímicas los ponen en un reino distinto al nuestro y distinto al reino vegetal, "el reino fungi" y para comprender la vida de este reino, se utiliza la micología, ciencia que los estudia. Está constituido por distintas clases de hongos, quitridiomycetos, los zigomicetos y los basidiomicetes (Arauz, 1998, p. 108). En la clase de los basidiomicetes podemos citar a los hongos comestibles, los venenosos y los alucinógenos, el moho del pan es un ejemplo de los del tipo zigomicetos los quitriomicetos son de tamaño microscópico y generalmente son parásitos de plantas, animales, protistas y otros hongos.

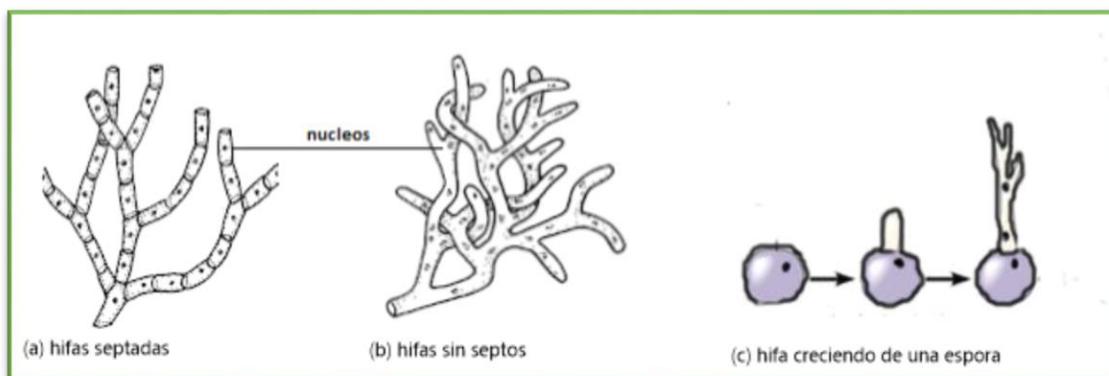
Se dice que solo el 1% de los hongos que hasta ahorita se conocen son perjudiciales para la salud o para la agricultura, el resto de los hongos son de gran ayuda en las prácticas humanas como farmacéutica, agricultura, alimenticia, biotecnología y en ecología al degradar moléculas complejas y hacer reciclaje de la materia.

Los hongos se clasifican como seres eucariotas aclorófilos con pared celular que se alimentan por absorción de moléculas orgánicas, a diferencia de otros seres vivos; no

realizan fotosíntesis como las plantas y no ingieren partículas como el reino animal, sino que liberan enzimas que degradan moléculas orgánicas complejas desempeñando una digestión extracelular (Arauz, 1998, p.105). Sin embargo, algunos se nutren fagocitando otros seres vivos. Proceso catabólico y morfología

La mayoría de los hongos son aerobios, pero existen algunos que son anaerobios facultativos y otros cuantos que fuera de tener mitocondrias, contienen hidrogenosomas, (anaerobios estrictos), (García, Cepero De, 2012, p.3).

Los hongos están constituidos por hifas (**Figura 3**) que a su vez forman micelios y estas pueden ser septadas (divididas en tabiques), su pared celular está constituida por un compuesto químico llamado quitina (Arauz, 1998, p. 108).



**Figura 3.** Hifas y esporas didácticas

Los hongos son importantes en el equilibrio ecológico y en la simbiosis con otros seres vivos, en la industria nos beneficiamos enormemente de los hongos gracias a la creación de antibióticos y fermentados. Dentro del pequeño porcentaje de hongos perjudiciales se encuentran los fitopatógenos y los patógenos. Los hongos fitopatógenos pueden atacar toda la planta o fruto causando necrosis, clorosis, hiperplasia, hipertrofia, entre otras. Los patógenos son los que causan daños a la salud humana, tal el caso del hongo *Candida* que causa candidiasis.

Aunque son distintos tipos de hongos fitopatógenos y distintas hortalizas afectadas, por razones ya expuestas en la introducción de este trabajo, nos enfocaremos en *Colletotrichum spp* y en *Botrytis cinerea* causante de la antracnosis, y del moho gris.

### 2.3.1 Moho gris

El sector de las fresas es el más afectado por este problema, generando pudrición del fruto, deteriorando la flor y, coloraciones grises (Koike, T & Bolda, M, 2016),

mencionado con anterioridad, el moho gris es debido a *Botritis cinérea*, su desarrollo es mediante la infección a través de sus esporas por heridas o aberturas en los vegetales colonizando una zona específica y al cabo de un tiempo rompiendo las barreras de defensa del vegetal al grado de diseminar por el tejido circundante volviendo nuevamente al ciclo de reproducción-infección, sus esporas se dispersan gracias a la acción de los vientos o insectos (E. P. Benito et al., 2000; Jarvis, 1977).

### 2.3.2 Antracnosis

La antracnosis, es una enfermedad de hortalizas y frutas donde se ve involucrado uno o varios hongos fitopatógenos, entre ellos el de mayor porcentaje de incidencia es el proveniente del tipo *Colletotrichum spp.* Esta enfermedad se caracteriza por presentar lesiones oscuras y hundidas a los frutos que pudieran padecerla. (Trinidad-Ángel et al., 2017). En Michoacán se le conoce a este padecimiento de las huertas de aguacate; como el síndrome de la roña del aguacate, siendo dos tipos de cepas de *Colletotrichum spp.* que se pueden encontrar en mayor porcentaje en aislamientos; *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. (Lemus-Soriano & Pérez-Aguilar, 2017).

#### 2.3.2.1 *Colletotrichum acutatum*

Se caracteriza por presentar colonias con centro gris, y un margen color salmón con conidios hialinas unicelulares, rectas, fusiformes con ambos extremos terminados en punta (Trinidad-Ángel et al., 2017).

#### 2.3.2.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

Produce colonias de blanco grisáceo a oscuro, micelio aéreo liso y afelpado en mechón, asociado a conidióforos. (Lemus-Soriano & Pérez-Aguilar, 2017). Sin embargo, en este trabajo nos enfocaremos en la experimentación solo con la cepa *Colletotrichum gloeosporioides*, su comportamiento es similar a *Colletotrichum acutatum*.

## 2.4 Fungicidas y cambio climático

Los fungicidas son indispensables para la seguridad alimentaria, pero en esa seguridad de alimentar a las personas reside el riesgo sanitario y ecológico, de tal manera que organizaciones con poder internacional como la FDA está ampliando sus políticas dirigidas a la producción agrícola libre de compuestos tóxicos.

## 2.4.1 Fungicidas y sus grupos

Hay una gama variable y extensa de fungicidas, inclusive el uso de algunos ha sido prohibido en algunos países, pero todos tienen el objetivo de combatir hongos fitopatógenos, sin embargo, su uso constante ocasiona daños ambientales además de que los hongos generan resistencia con mucha facilidad lo que conlleva a la constante investigación y desarrollo de nuevos fungicidas y por lo tanto el mercado está con una amplia gama de fungicidas (Zubrod et al., 2019). Se mencionará estos grupos y sus características en la **Tabla 1**. Con el cambio de transición a la producción de alimentos libres de compuestos dañinos, los fungicidas ecológicos también están empezando a entrar en el mercado y este seguirá evolucionando.

**Tabla 1.** Fungicidas más usados (Botello, 2005, Pg. 191-198).

Grupo	Tipo de compuesto	Ejemplos	Algunos daños
<b>Inorgánicos</b>	Azufre, derivados del cobre	Oxicloruro,	
<b>Organometálicos</b>	Orgaestánicos, Organomercuriales, Ditiocarbámicos, Fenólicos, Ftalímicos	Acetato de fenilmercurio  PROHIBIDO	Bioacumulación, intoxicación humana, Daños a biota acuática, daños a las cadenas tróficas, aún sigue en revisión daños adyacentes.
<b>Orgánicos</b>	Sulfonamidas, Bencimidazoles, Quinonas, Tiofanatos, Oxatiinas	Zineb, Tiabendazol	La degradación en el suelo da a compuestos tóxicos, modifican los ciclos biogeoquímicos en el suelo, daño acuático, algunos son altamente tóxicos para especies y humanos.

Los fungicidas más comercializados y utilizados son, el Benomilo, Carbendazima y el Maned, todos con un grado elevado de toxicidad (Oviedo Berrocal, 2014), sin embargo, en México según el diario oficial de la federación que no ha sido modificado

desde el año 1991 y que solo tiene prohibición en la producción, uso y distribución de 20 fungicidas y restricción de 19, estos fungicidas mencionados no figuran en esas listas del diario oficial de la federación, comparándola con la lista de prohibición en Estados Unidos donde es mucho más amplia, estos tres están dentro de ella en el apartado de restricciones (AR(Alliance Rainforest), 2011) .

## 2.5 Aceites esenciales

Cuando se arranca el pétalo de una flor, una hoja, una rama o cualquier parte de una planta, esta liberará un perfume, esto significa que se ha liberado un aceite esencial (Montoya, 2010, p. 11). Los aceites esenciales los podemos conocer como esencias, aceites volátiles o etéreos. Para Montoya los aceites esenciales son mezclas de compuestos volátiles, la mayoría se pueden clasificar como terpenos o árenos. Estos pueden tener en sus estructuras químicas algún grupo fenólico, aldehído, cetona, alcohol o éter fenólico. Estos aceites esenciales provienen de los ciclos catabólicos de las plantas y estos les brindan de manera natural propiedades de defensa ante insectos, hongos, virus y bacterias al igual que propiedades sensoriales y de aroma(Montoya, 2010).. Sin embargo, es fundamental considerar sus características fisicoquímicas de los compuestos esenciales ya que de ello depende su manejo; por ejemplo, dentro de sus características fisicoquímicas un factor limitante en su manejo es su alta volatilidad.

- Líquidos a temperatura ambiente
- Muy volátiles
- Inflamables
- Solubles en disolventes orgánicos
- Liposolubles
- Arrastrables en vapor de agua
- Transfieren aroma al agua
- Masa molecular no elevada

### 2.5.1 Aplicaciones

Debido a sus propiedades antisépticas los aceites son utilizados tanto en la vida cotidiana como en diferentes sectores de la industria (farmacéutico, ganadero, alimenticio, cosmético y fitosanitario), (López Camacho, 2007 Montoya, 2010, p. 23). El poder antiséptico se manifiesta frente a diversas bacterias patógenas, incluso cepas resistentes a los antibióticos también presentan actividad contra hongos. Los aceites más potentes provienen del tomillo, clavo, lavanda y eucalipto, sus moléculas destacadas son; linalol, eucaliptol y timol, siendo el timol es 20 veces más antiséptico que el fenol (Bruneton, 2001, p. 500).

La principal composición de los aceites esenciales son los grupos fenólicos, sin embargo, no se ha identificado con claridad el mecanismo de reacción que estos tienen para atacar bacterias u hongos, pueden alterar su membrana celular o alterar su material genético, de manera general se sabe que el ataque de los aceites esenciales se puede llevar; en la pared celular, membrana celular, síntesis de proteína, en su genética o síntesis de esta. (Sociedad et al., 2011).

#### 2.5.1.1 Timol y toxicidad

Ciertos estudios han mostrado que el timol tiene un amplio efecto bactericida y fungicida en el rango de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (de Castro et al., 2015; Numpaque et al., 2011). Se le atribuye efectos membrana-tróficos que perfora la membrana citoplasmática e induce a la fuga de material intracelular, a una fuga excesiva de iones potasio en primera instancia, estos efectos sobre el potencial transmembrana desencadena inhibición de los generadores de ATP (Chauhan & Kang, 2014; Shapiro & Guggenheim, 1995). Por otro lado, el timol sufre una biotransformación a iones y compuestos secundarios (Oviedo Berrocal, 2014), esta biotransformación del timol debido a hongos y bacterias en compuestos secundarios lo hace inofensivo ante hongos benéficos en el proceso trófico de los campos comparándolo con fungicidas tradicionales que no son bio-transformados tan fácilmente y perduran en el ambiente mucho tiempo contaminando y dañando al ecosistema.

### 3 Antecedentes

Las investigaciones dirigidas a híbridos con función biocida de manera general ya están con bastante desarrollo especialmente en el sector de salud pública contra bacterias, sin embargo, el desarrollo de híbridos con actividad biocida dirigidos al sector agrícola y específicamente para mitigar problemas causados por hongos fitopatógenos es un asunto más reciente, listo para ser explorado. La génesis de híbridos comienza teniendo como bases teóricas y experimentales sobre compuestos orgánicos o compuestos biológicamente activos que ya hayan sido estudiados y que tengan ciertas características biocidas y que tengan el potencial de ser unidos a matrices con el objetivo de mejorar sus condiciones de uso y mejorarle su resistencia a la degradación.

### 3.1 Estudios de base

En la **Tabla 2** se resumen algunos estudios que fueron la base para el desarrollo del presente trabajo, considerando las condiciones y los materiales empleados para ingeniar cambios en el desarrollo experimental, especialmente en las pruebas in vitro.

**Tabla 2.** Antecedentes de híbridos y extractos esenciales

Titulo-autor-año	Material utilizado	Pruebas realizadas	Resultados
<p>ZnAl Hidróxidos dobles laminares impregnados con aceite de eucalipto como un eficiente material híbrido contra bacterias multirresistentes</p> <p>(Lobo-Sánchez et al., 2018)</p>	<p>ZnNO<sub>3</sub> Y AlNO<sub>3</sub> (al 99%) solución de NaOH, al (99%) aceite esencial de eucalipto extraído de hojas de eucalipto con etanol y acetona.</p>	<p>Síntesis de HDL a distintas relaciones molares (2,3,4) y distintos pH (7.5 y 10).</p> <p>Síntesis de híbridos a pH de 10 (HDL-aceite esencial de eucalipto)</p> <p>Pruebas realizadas in vitro contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. y <i>Staphylococcus</i> sp.</p>	<p>El HDL sintetizado a pH 10 mostró una menor pureza y mayor concentración de ZnO lo que ayudo a una mayor inhibición de las bacterias a 4 mgmL<sup>-1</sup>.</p> <p>Los híbridos mostraron inhibición también a 4mgmL<sup>-1</sup>, pero también mostraron efecto bactericida a 14mgmL<sup>-1</sup>.</p>
<p>Actividad in vitro de aceites esenciales de lavanda híbrida contra cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a múltiples fármacos antibióticos.</p> <p>(Donadu 2018)</p>	<p>Aceites esenciales de dos variedades de lavanda.</p> <p>Medios para emulsión</p>	<p>16 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes con inmunidad a antibióticos, mostrado con diversas pruebas a diversos antibióticos.</p> <p>Pruebas in vitro</p>	<p>Lavanda Grosso mostró actividad antibacteriana en concentración del 8%v/v de las soluciones. (mínimo actividad bactericida).</p> <p>Lavanda Sumian mostró un mínimo de 16%v/v en la mayoría de las cepas.</p>

			<p>Mayor concentración de aceites contenidos en las lavandas:</p> <p><i>1,6 Octadien – 3 - ol</i> (32%)</p> <p><i>1,3,6 - Octatriene</i> (34%)</p> <p><i>Eucaliptol</i> (9.89%)</p>
<p>Actividad antifúngica de aceites esenciales asociados con carboximetilcelulosa contra <i>Colletotrichum acutatum</i> en fresas.  (Weisany et al., 2019)</p>	<p>Los aceites esenciales fueron extraídos por hidrodestilación de las plantas (<i>E. staigeriana</i> (Itatinga - SP, Brazil), <i>L. sidoides</i> (Campinas - SP, Brazil) and <i>P. pseudocaryophyllus</i> (Cananéia - SP, Brazil)</p>	<p>Las evaluaciones contra <i>Colletotrichum acutatum</i> en agar dextrosa fueron con contacto directo de los aceites, así como distintas mezclas de estos.</p> <p>In vivo se realizaron pruebas con emulsiones de los aceites y una base de glicerol.</p>	<p>In vitro, observaron inhibición de las micelas a concentraciones de 125 a 250 <math>\mu\text{LL}^{-1}</math>. de las mezclas de aceite esencial.</p> <p>Las pruebas in vivo mostraron un control en la antracnosis de la fruta (fresa) retardándole hasta 7 días tal y como sucede con tratamientos convencionales, según la literatura.</p>
<p>Un plaguicida ecológico bionanohíbrido ZnAL-NADS como tratamiento para la enfermedad de la pudrición blanda en</p>	<p>Sintetizaron HDL (ZnAl-NO<sub>3</sub>) y su híbrido (ZnAl-NADS), NADS: antibiótico de bajo espectro llamado ácido Nalidixico</p>	<p>Pruebas realizadas in Vitro contra <i>E. coli</i> y pruebas in vivo protegiendo la pudrición blanda de las</p>	<p><i>Escherichia coli</i> tuvo un CMI de 75 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math> y un CMB de 150 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></p> <p><i>Pectobacterium carotovorum</i> tuvo un</p>

la papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) (Morales-Irigoyen et al., 2018)		papas, causada por <i>Pectobacterium caratovororum</i>	CMI de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un CMB de 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$
---	--	---	---

Desde luego que el interés por el desarrollo de materiales híbridos también está empezándose a valorar con otro tipo de matrices distintas a los HDL, pero buscando lograr los mismos objetivos de sintetizar un material híbrido que sea amigable con el medio ambiente y con potencial a ser usado como las llamadas aplicaciones agrícolas verdes. Por ejemplo; materiales como Quitosano y gel de sílice que son abundantes en la naturaleza y de bajo costo, han sido acomplejados como híbridos y probado su efecto antifúngico contra *Phytophthora infestans*, (Nguyen et al., 2019), hongo protista fungoide que infecta papas principalmente. Por otra parte, la FAO (Food and Agriculture Organization) reconoce el uso de ciertos silicatos para el control de hongos fitopatógenos y los nano híbridos como la Sepiolita ha sido estudiada contra ciertos hongos como Fusarium, (Sidhu et al., 2020), hongo altamente fitopatógeno. Lo que se considera ya como tecnologías que están revolucionando los sectores científico-industrial (Alghuthaymi et al., 2021). Por otra parte, los HDL y la generación de pesticidas verdes está entrando en trance al incorporar el Cinamato de metilo, compuesto aromático proveniente de cierta variedad de eucalipto, formando un nano-híbrido con características fungicidas y bactericidas contra *Phytophthora*, protista destructor de plantas de la clase *Oomycetes* y *Salmonella bongori*, *E. coli*, *Staphilococos aureus* y *Listeria monocytogenes*, bacterias patógenas (Bugatti et al., 2019). Otros híbridos desarrollados a base de HDL y benzoato también han demostrado gran poder bactericida, fungicida y un alto potencial material para el desarrollo de films (Mishra, Dash, Pandey, et al., 2018). Por estas razones los HDL están siendo objeto de estudio para mejorar sus cualidades y de desarrollo de biomateriales o materiales híbridos con un alto valor en las tecnologías modernas (Mishra, Dash, & Pandey, 2018).

## 4 Justificación e hipótesis

### 4.1 Justificación

La investigación acerca de la eficacia del potencial fungicida del timol y las características fisicoquímicas de los materiales HDL, permitirá formar un material híbrido con acción fungistática, en específico contra el *Colletrotrichum spp* y *Botritis cinérea* mitigando la problemática ambiental y sanitaria que ocasionan los funguicidas convencionales. Posteriormente es importante estandarizar un método de síntesis del material híbrido con condiciones convenientes para garantizar un costo de producción accesible, para poder hacer escalas a futuro de forma in situ.

## 4.2 Hipótesis

La síntesis de materiales híbridos a base de *ZnAl* con timol permitirá cambiar el uso tradicional de fungicidas por aquellos ecológicos que garanticen la seguridad en el equilibrio del ambiente y seguridad sanitaria. En específico lograrán inhibir el crecimiento de *Colletotrichum spp* y *Botritis cinérea*.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar materiales híbridos biocompatibles capturando timol en una matriz inorgánica laminar a base de hidróxido doble laminar ZnAL, para su posterior evaluación como agente fungistático contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botritis cinérea*.

### 5.2 Objetivos específicos

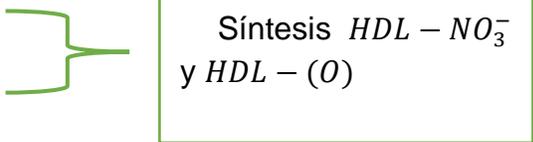
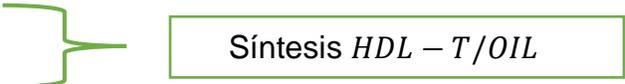
- Sintetizar los hidróxidos dobles laminares biocompatibles, *ZnAl* de relación molar  $M^{2+}/M^{3+} = 2$ , por la ruta de hidrólisis de urea y obtener óxidos mixtos *ZnAl(O)* por la ruta de combustión como base para la obtención de un híbrido.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los sólidos mediante difracción de rayos-X, espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, análisis termogravimétrico y microscopia electrónica de barrido.
- Obtener los materiales híbridos a base de *HDL-ZnAl* y moléculas de timol.
- Caracterizar la interacción huésped-receptor en los materiales híbridos, por las técnicas antes mencionadas con la finalidad de cerciorar la obtención del híbrido.
- Evaluar in vitro el desempeño de los materiales híbridos en la inhibición del crecimiento de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botritis cinérea*.
- Evaluar el efecto fungistático del híbrido in vivo contra *Botritis cinérea*.
- Evaluar la estabilidad del timol y del híbrido mediante el cambio del área bajo la curva de los espectros de absorción UV del timol en HPLC

## 6 Desarrollo experimental

En este capítulo se describen los métodos empleados para el desarrollo de los HDL, el desarrollo de los híbridos, así como los métodos e instrumentos empleados para su caracterización fisicoquímica y el estudio del efecto fungistático del material híbrido contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botritis cinérea*. Los experimentos biológicos se llevaron in vitro para ambas cepas de hongos, sin embargo, adicionalmente se llevó un experimento in vivo para *Botritis cinérea*, experimento desarrollado en fresas,

concluyendo con experimentos de identificación-conservación del timol por medio de cromatografía líquida HPLC.

Los HDL normalmente son señalados con sus iniciales, sin embargo, además de señalar estos materiales como HDL, se anexará con guion seguido el anión o molécula presente en su estructura, de esta manera se diferenciara el HDL del híbrido además que mostrara en todo momento el anión, molécula o compuesto que está interactuando con el HDL, por ejemplo; uno de los HDL con los que se experimentó en este trabajo es un material con nitratos albergados en su región interlamina, provenientes de su síntesis inicial, de tal manera que la nomenclatura elegida para fines prácticos será  $HDL - NO_3^-$  y  $HDL - (O)$  para los respectivos óxidos mixtos provenientes de la combustión en la síntesis de HDL. Para el material híbrido será  $HDL - T$  y  $HDL - Extracto$  donde T corresponde a la molécula de timol que se empleó en su síntesis, el extracto corresponde a que se utilizó extracto de tomillo, de antemano se va a omitir estar indicando los cationes que conforman todos estos materiales, pero es de saberse que los cationes empleados en estas síntesis corresponden a  $Zn^{+2}$  y  $Al^{+3}$ , como lo dictan los objetivos y el título del presente trabajo, tal vez el lector se pregunte porque se optó por utilizar estos dos metales y no  $Mg^{+2}$  y  $Al^{+3}$ , siendo los cationes más representativos y empleados para los HDL según lo expuesto en el marco teórico y basados en la literatura, por tal motivo es necesario señalar que en el desarrollo experimental se emplearon diversas rutas y metodologías para lograr obtener el híbrido deseado y se desecharon las rutas menos óptimas y se eligió los materiales con resultados más favorables para los fines de este trabajo, de tal manera que los cationes  $Zn^{+2}$  y  $Al^{+3}$  fueron los metales di y trivalentes con mejor eficacia y las rutas de síntesis más asertivas para este experimento fueron:

- Ruta de hidrólisis de urea
  - Obtención de óxidos mixtos
- 
- Síntesis  $HDL - NO_3^-$   
y  $HDL - (O)$
- Intercambio iónico
  - Ruta de reconstrucción
- 
- Síntesis  $HDL - T/OIL$

Sin mucho preámbulo se identifican los puntos más relevantes en cada proceso de la experimentación haciendo notación de estos para favorecer su reproducibilidad científica.

## 6.1 Síntesis de los hidróxidos dobles laminares

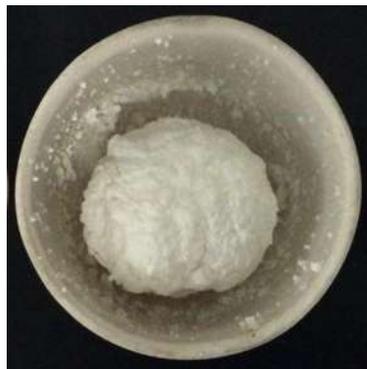
### 6.1.1 Ruta para óxidos mixtos

Este método fue empleado con el objetivo de lograr rapidez en los procesos de síntesis de materiales híbridos, esto debido a que al llevar una combustión directamente en el momento de síntesis de un HDL se obtiene directamente un material semejante al proceso de calcinación de un HDL, de tal manera que no se obtiene un HDL íntegro, sino sus óxidos mixtos provenientes de la combustión, por lo que podemos decir que es un método de síntesis de óxido de zinc y aluminio ya que este método es empleado con estos cationes (Patil et al., 2002), siendo que directamente se puede sintetizar un híbrido sin la necesidad de calcinar un HDL, recordemos que al llevar estos óxidos mixtos en una solución con los aniones que se deseen intercalar o impregnar, los HDL recobran su estructura cristalina laminar y a este fenómeno se le conoce como efecto de reconstrucción (Bellotto et al., 1996). En este proyecto se emplearon ciertas modificaciones en síntesis para la obtención de los óxidos mixtos, dado que el método requiere un combustible para llevar a cabo la acción térmica, se empleó sacarosa como tal, una temperatura de 450 °C y 12 horas de proceso térmico, manteniendo la relación molar de 2 entre  $Zn^{2+}$  y  $Al^{3+}$

#### 6.1.1.1 Detalles del proceso de experimentación

Se preparó y colocaron las soluciones de nitrato de Zinc y nitrato de aluminio ( $Zn(NO_3) \cdot 6 H_2O$ ,  $Al(NO_3) \cdot 9H_2O$ ), usando agua desionizada y descarbonatada, se homogeneizó con sacarosa, posteriormente el procedimiento constó de llevar a combustión en mufla a 450 °C durante 5 minutos, previamente eliminado el exceso de agua en estufa a 90 °C para darle eficacia al proceso de combustión, al final se observó un material negro poroso, para eliminar impurezas de carbono, el material fue sometido a tratamiento térmico obteniendo un material blanco (**Figura 4**).

El proceso térmico al que se llevó el material fue pasado los cinco minutos en mufla a 450 °C, se mantuvo a esa temperatura constante en la mufla por un periodo de 12 h.



**Figura 4.** HDL – (O) después de tratamiento térmico

### 6.1.2 Ruta por hidrólisis de urea

Este método fue recogido de la literatura y desarrollado tomando en cuenta las especificaciones que Brindley trabajó, (Brindley, 1980). Para la síntesis del material HDL-NO<sub>3</sub> se disolvieron 0.335 moles de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 0.165 moles de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O en 500 mL de agua desionizada libre de CO<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 1.65 mol de urea y 1 mol de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y la solución resultante se colocó en un matraz de bola de tres bocas de 500 mL equipado con un sistema de reflujo. El sistema se purgó por burbujeo de gas argón durante 1 h y la temperatura se incrementó a 90 °C con ayuda de un baño termostaticado con arena. Después de 10 h a esa temperatura, el precipitado blanco obtenido se centrifugó durante 15 min, se lavó varias veces con agua desionizada caliente y libre de CO<sub>2</sub>. Finalmente, el sólido se secó a 120 °C durante 12 h en una estufa. El sólido preparado tuvo una relación molar Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup>= 2.

## 6.2 Preparación de los materiales híbridos

Debido a la poca información que se tiene en la literatura sobre híbridos HDL-aceites esenciales, se consideraron varios mecanismos sobre síntesis de híbridos de manera general.

### 6.2.1 Intercalación por intercambio iónico

#### 6.2.1.1 Sistema de reacción

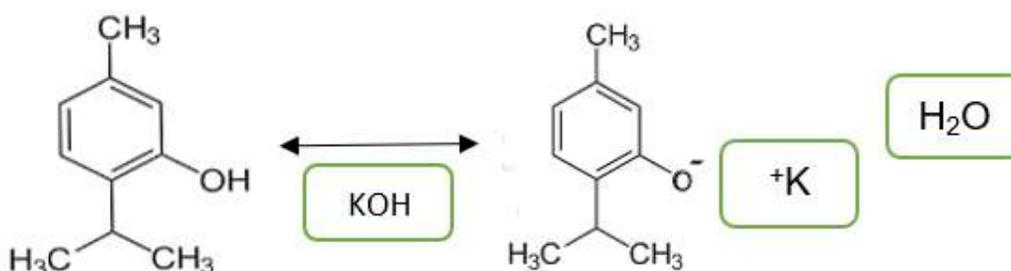
Se preparó el sistema para las reacciones químicas buscando generar una atmósfera inerte para evitar que las moléculas de CO<sub>2</sub> del ambiente se intercalaran en el HDL como carbonatos debido a su alta afinidad (Miyata, 1975), para esto el sistema constó de un matraz tres bocas donde se agregaron 25 mL de agua desionizada y hervida previamente más 25 mL de extracto esencial de tomillo, en el caso de timol con pureza

del 98% (Timol, N.F., J.T.Baker) se agregó el equivalente a 4.8 mmol considerando el doble de concentración en relación estequiométrica con el HDL para garantizar su intercalación o impregnación (Miyata, 1975) además de que para disolver los cristales del timol fue necesario agregar 12.5 mL de alcohol etílico grado 96° G.L. Posteriormente se agregó  $NaOH$  o  $KOH$  al 0.1 M hasta obtener un pH de entre 9 y 11, se burbujeó el sistema con un globo relleno de argón instalado en una de las bocas del matraz para purgar el aire. Por último, se agregó el HDL (0.546 g). Se dejó el sistema en reacción durante 7 días cuidando que estuviera inerte el sistema por el flujo de argón como se muestra en la **Figura 5**, durante los siete días de reacción no hubo un cambio físico en el sistema.

La acción del  $NaOH$  o  $KOH$  sobre el timol (**Figura 6**), garantiza su des-protonación, así obteniéndolo en su forma de sal y buscar la intercalación y/o impregnación.

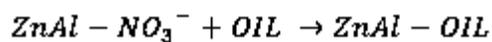


**Figura 5.** Sistema montado para la reacción de intercalación e intercambio iónico



**Figura 6.** Esquema de la des-protonación del timol

En la **Figura 7** se muestran las ecuaciones químicas generales del intercambio iónico.



**Figura 7.** Esquema representativo de ecuaciones químicas del intercambio iónico

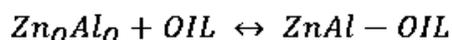
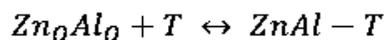
Pasados los siete días de reacción, se separó el material por centrifugado, se lavó con agua desionizada por seis veces. Posteriormente el material fue puesto en estufa a 45 °C para eliminar humedad durante 48 h, el material híbrido obtenido tuvo una coloración blanca, **Figura 8.**



**Figura 8.** Material híbrido después de secado

### 6.2.2 Ruta de reconstrucción

El procedimiento para el sistema y seguimiento de las reacciones es exactamente igual que en la descripción anterior, sin embargo, la diferencia es el tipo HDL que se utilizó, para este caso se agrega un 40% en peso menos de  $ZnAl(O)$ , proveniente de la síntesis de obtención de óxidos mixtos (combustión).



**Figura 9.** Esquema representativo de ecuaciones en el proceso de reconstrucción

## 6.3 Caracterización fisicoquímica de los materiales

La obtención de información respecto a la estructura y propiedades fisicoquímicas de los materiales sintetizados es esencial para el seguimiento del desarrollo experimental, se optó por la caracterización más empleada en este tipo de experimentos.

### 6.3.1 Difracción de rayos-X (XRD)

La caracterización estructural se realizó por difracción de rayos-X (XRD) se llevó a cabo en un difractómetro D9 Advance fabricado por Bruker, operado a 45 Kv y 40 mA, los rayos x se produjeron a partir de un tubo de cobre con una longitud de onda de 1.5418 Å y se empleó una velocidad de barrido de 0.02° en tiempo de integración de 0.6 s/paso, y un intervalo de barrido de 2θ de 3.5 a 60°, el tiempo total de barrido por muestra fue de 28.5 min, mediante la técnica de Bragg Brentano.

Por difracción de rayos-X se aplicó la ecuación de Sherrer para determinar el tamaño de partícula de los materiales.

$$D_{hkl} = \frac{\kappa \lambda_{Cu}}{\beta \cos \theta_{hkl}}$$

Donde  $\kappa$  es el factor de forma del cristal y depende de la geometría, usualmente el factor se atribuye a un valor de 0.9, que corresponde a esférica.  $\lambda$  es la longitud de onda característica del tipo de cátodo emisor de fotones, normalmente es usado uno de cobre,  $\lambda_{Cu} = 0.15406$  nm,  $\theta$  es el ángulo de Bragg y  $\beta$  es el ancho de la reflexión medida a la mitad de la intensidad máxima en radianes (FWMH) por sus siglas en inglés (Goyeneche, 2018).

### 6.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

El estudio analítico para identificar compuestos orgánicos fue a través de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), llevados a cabo en un espectrofotómetro Nicolet iS10 con un intervalo espectral de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  a temperatura ambiente, mediante la técnica de ATR con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , velocidad de espejo de 0.4747 y cristal de diamante como detector.

### 6.3.3 Análisis termogravimétrico

Se realizó el análisis termogravimétrico de la muestra en un equipo Discovery TGA5500 marca TA instruments ® con una rampa de calentamiento de 10°C/min entre 0°C a 800°C y utilizando un flujo de nitrógeno de 25 mL/min como purga.

### 6.3.4 Microscopía electrónica de barrido

El análisis morfológico se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), a través del equipo JEOLJSMIT300LV, doble detector (LV-SEC) EDS a 35° opuestos 180°, con platina motorizada en los 5 ejes con movimiento eucéntrico a cualquier distancia, lentes tipo zoom y navegación de imagen a colores y observación en platina de enfriamiento a intervalo de temperatura -30 a 50 °C. Los análisis se realizaron a 20 KV, resolución de x30000, x20000, x10000 y x5000.

## 6.4 Evaluación de la actividad antifúngica

Las pruebas biológicas fueron realizadas en el laboratorio de biotecnología de plantas (U-3) del instituto de Químicas Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con la colaboración y supervisión del Dr. Homero Reyes de la Cruz encargado del laboratorio y el Dr. Jesús Salvador López Bucio.

### 6.4.1 Material fitopatógeno

Las cepas de los hongos fitopatógenos fueron adquiridas en el mismo laboratorio de biotecnología de plantas (U-3); *Botrytis cinérea* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

### 6.4.2 Pruebas in vitro ante *Colletotrichum gloeosporioides*

#### 6.4.2.1 Preparación de cultivos

Los medios de cultivo de acuerdo con la micología y la microbiología, son mezclas nutritivas que se utilizan para el aislamiento, identificación, desarrollo, reproducción e identificación de aquellos organismos que se desea analizar y como cualquier otro ser vivo, los hongos fitopatógenos deben tener ciertas condiciones para su desarrollo, donde debe haber presencia de macro y micronutrientes, así como condiciones adecuadas de temperatura, pH, humedad y asepsia. Se utilizó el medio papa-dextrosa-agar (PDA) perteneciente a la categoría de los medios complejos o semisintéticos, siendo este el más empleado en la literatura y prácticas de laboratorio, se preparó por las indicaciones dadas por el fabricante, las condiciones de inocuidad se generaron por esterilización en autoclave y el uso de campana con flujo laminar con previa irradiación de ultravioleta.

### 6.4.2.2 Dilución y concentración de los materiales

Los materiales se diluyeron con dimetilsulfoxido (DMSO) previamente a agregar a las placas de agar, las diluciones se realizaron de acuerdo a los cálculos estequiométricos, considerando que el timol se encuentra en un 40% presente con la matriz para obtener concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de la molécula biológicamente activa (timol). Esto con base en la literatura que indica el rango de concentración fungistático que genera el timol, (Oviedo Berrocal, 2014; Sofía et al., 2015).

### 6.4.2.3 Preparación de las placas

El APD una vez esterilizado según las indicaciones del fabricante se vertió en cajas Petri de 60 por 15 mm bajo la influencia de la campana y flujo laminar para mantener la esterilidad, agregándoles 10 mL de agar previamente mezclado con las soluciones de los materiales a las concentraciones correspondientes, (Tabla 3), asegurando concentraciones de 5, 25 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y de timol para su evaluación. Cabe señalar que las primeras pruebas fueron a 5, 25 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el caso de la solución con timol puro y en el híbrido por reconstrucción *HDL – T*, una vez observando la curva de inhibición se probaron los de otros materiales a una concentración intermedia.

**Tabla 3.** Preparación de las cajas Petri y las concentraciones diluidas de los materiales

Muestras	Concentración
Control	Por cuatuplicado
Blanco	150 $\mu\text{L}$ de DMSO por cuatuplicado
Blanco con ( <i>HDL – NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i> )	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cuatuplicado
Blanco con ( <i>HDL – (O)</i> )	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cuatuplicado
Timol en solución	5, 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cuatuplicado
Híbrido por reconstrucción ( <i>HDL – T</i> )	5, 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cuatuplicado
Híbrido por reconstrucción ( <i>HDL – Ex</i> )	25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cuatuplicado
Híbrido por intercambio iónico ( <i>HDL – T</i> )	25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cuatuplicado
Híbrido por intercambio iónico ( <i>HDL – EX</i> )	25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cuatuplicado

#### 6.4.2.4 Inoculación de las placas con *Colletotrichum gloeosporioides*

Las placas una vez preparadas y solidificadas se inocularon con discos de micelio de *Colletotrichum gloeosporioides*, las inoculaciones se hicieron por cuadruplicado, para todas las pruebas, los discos de micelio se obtuvieron de cepas previamente crecidas y maduradas en un lapso de 10 días, estos en un tamaño de 5mm, se aseguró el área de inoculación con dos mecheros y desinfectando el área de trabajo con etanol al 96°, las placas inoculadas se metieron a cámara de crecimiento bajo condiciones específicas como; 25 °C, humedad relativa, ausencia completa de luz y aisladas de cualquier contaminante, esto debido a que son las condiciones esenciales para el desarrollo de las cepas.

#### 6.4.3 Pruebas in vitro contra *Botritis cinérea*

Una vez teniendo datos sobre las pruebas contra *Colletotrichum gloeosporioides*, se eligió el material más eficaz y de mayor potencial para llevarlo contra *Botritis cinérea*, quedando la preparación del experimento como se muestra en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Diluciones de los distintos materiales para los experimentos in vitro

Muestra	Concentraciones
Control	Por cuadruplicado
Blanco ( <i>HDL – (O)</i> )	50 µg mL <sup>-1</sup> por cuadruplicado
Timol en solución	5, 25 y 50 µg mL <sup>-1</sup> por cuadruplicado
Híbrido por reconstrucción ( <i>HDL – T</i> )	5, 25 y 50 µg mL <sup>-1</sup> por cuadruplicado

#### 6.4.3.1 Determinación de efecto fungistático

Para *Colletotrichum gloeosporioides*, la curva exponencial de crecimiento está entre las primeras 96 h, transcurridas estas horas se le midió el crecimiento radial de los hongos para su análisis estadístico y discusión. *Botritis cinérea*, es un hongo de crecimiento muy irregular, de tal manera que en ocasiones puede tardar más en crecer inclusive 10 días, en ocasiones el crecimiento es rápido. Se estuvo monitorizando día a día para vigilar su crecimiento y la cepa mostró una evolución en su desarrollo comparado con otras ocasiones, por lo que su crecimiento exponencial se apreció pasadas las 48 h, transcurrido este tiempo se tomaron medidas de su crecimiento radial en cuatro áreas distintas para cada placa y se sacó el promedio, así como su análisis estadístico.

#### 6.4.4 Evaluación de la actividad antifúngica in vivo

Se hicieron dos distintas evaluaciones, el material *HDL – T* obtenido por reconstrucción y una réplica del mismo, siendo el de mayor eficacia.

Las pruebas se realizaron contra *Botritis cinérea*; Se inocularon 16 fresas con esporas del hongo, la recolección de esporas fue mediante raspado de micelio aéreo de una caja Petri inoculada previamente y envejecida por diez días (**Figura 10**). Una vez obtenido el raspado se procedió a diluir con agua estéril y destilada, posteriormente se filtró con una maya fina, las esporas pasan el filtro con el agua. Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer, una vez sabiendo la concentración de esporas en la solución se procedió a inocular las distintas fresas.

Las fresas fueron seleccionadas de tal manera que estuvieran lo más uniforme posible, tanto su aspecto físico y de maduración, se les eliminó el tallo y posteriormente fueron desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio al 20% v/v sumergiéndolas por 20 min, después se enjuagaron con agua esterilizada aplicándoles lo necesario para eliminar trazas de cloro. Finalmente se introdujeron por 10 min en las distintas soluciones de los materiales, cuatro para timol a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  en solución como comparativa, cuatro en agua y dimetilsulfoxido como control a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , cuatro en el híbrido *HDL – T* a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y cuatro más en una réplica del híbrido *HDL – T* a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Se montó un sistema de cajas donde se pusieron las fresas separadas entre sí, se inocularon con 100000 esporas. Se montaron tres sistemas, uno para los híbridos, otro para el control y otro para el timol puro, estos constaron de cajas envueltas en aluminio para evitar que entraran los rayos de luz (**Figura 11**), de tal manera que se sellaran para evitar corrientes de aire, se llevaron a cámara de crecimiento a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  vigilando cada 24 h para ver su evolución. Todo el procedimiento fue realizado en campana de flujo laminar y con previa desinfección con etanol al 96° y luz ultravioleta.



**Figura 10.** Cepa de *Botrytis cinérea* para su raspado



**Figura 11.** Sistema para las pruebas in vivo contra *Botrytis cinérea* en fresas

## 6.5 Análisis de conservación de timol mediante HPLC

La experimentación con el HPLC fue efectuada con un sistema de Water Alliance equipado con desgasificador de vacío, mezcla de solventes cuaternarios, muestreador automático y mezcla de matriz de diodos 2996 de agua. El espectro UV fue recogido en el rango 200-900 nm, extrayendo 274 para cromatogramas. La columna utilizada fue ACE C<sub>18</sub> (4.6 X 250  $\mu$ m). La fase móvil fue una combinación isocrática de acetonitrilo: agua, (50:50), inyectando un volumen de 10  $\mu$ l.

La solución de material híbrido en DMSO se preparó en cajas Petri con pozos, con agar papa dextrosa a una concentración de 12.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, tanto del material híbrido como

de timol puro, por triplicado, sin acción del hongo *Botritis Cinérea* y en contraste con la acción del mismo inoculando los pozos con un disco de 5 mm de diámetro de micelio del hongo, obteniendo alícuotas de 0.5 g de agar solidificado en los muestreos desde el tiempo cero, seguido de 72 h y finalizando con un muestreo a las 120 h del desarrollo del hongo. Las muestras obtenidas fueron trituradas y mezcladas en 1 mL de metanol grado HPLC, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min por dos ocasiones, el metanol obtenido de la separación de fases fue analizado en el HPLC para comparar la disminución del área bajo la curva correspondiente al pico de absorción UV de timol. La solución de timol puro para obtener la referencia del pico de absorción UV y del tiempo de retención en el HPLC fue elaborada en dos distintas concentraciones,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de metanol.

## 7 Análisis y discusión de resultados

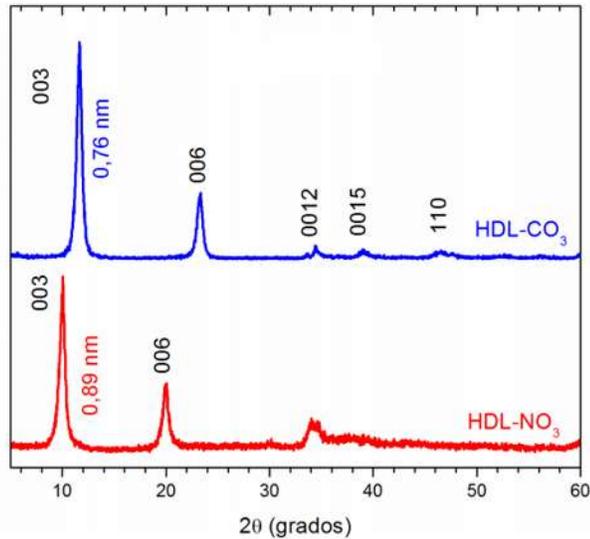
### 7.1 Datos fisicoquímicos de los materiales

Se utilizará la nomenclatura descrita en la metodología de la síntesis tanto para los HDL como para los híbridos con el fin de hacer más amena la identificación de los distintos compuestos.

Con el fin de generar confianza en los experimentos desarrollados y cerciorar el correcto proceso para el resultado esperado se analizó la estructura de los *HDL – NO<sub>3</sub><sup>-</sup>* y *HDL – (O)* por los métodos e instrumentos previamente ya mencionados, se hará la discusión indicando el tipo de material y por ende se identificará el método utilizado en su síntesis.

#### 7.1.1 Estructura cristalina

La estructura cristalina de cualquier HDL puede ser identificada con facilidad debido a los patrones de referencia en los espectros de los difractogramas prescritos en la literatura, de la misma manera gracias a eso se pueden identificar impurezas, falla en su morfología y la identificación del anión en la región interlaminar (**Figura 12**).

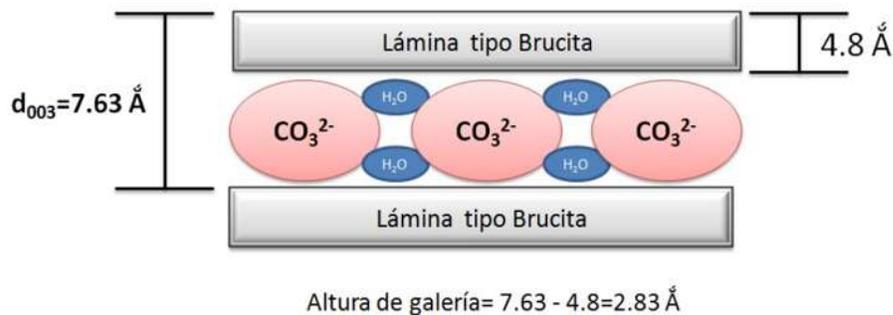


**Figura 12.** Gráfica de los espectros de difracción de rayos X típicos de HDL

(Jiménez & Arízaga, 2016).

Nótese en la gráfica de la **Figura 12** el plano de difracción con índices de Miller (003) es el más representativo para estos cristales y corresponde a la distancia interlamina que depende del tamaño del anión intercalado y que dependiendo del tamaño de la molécula aniónica este disminuye su ángulo o lo aumenta, en este caso podemos aducir que el anión carbonato es más pequeño que el anión nitrato, debido al desplazamiento a un mayor ángulo, los planos (006) y (009) corresponden a sus armónicos del plano (003).

Como ya se ha descrito con anterioridad, la distancia interlamina representativa al anión intercalado puede obtenerse por medio de restar el espesor de la estructura de la brucita, a lo que se le conoce como altura de galería, tal como se muestra en la **Figura 13**.

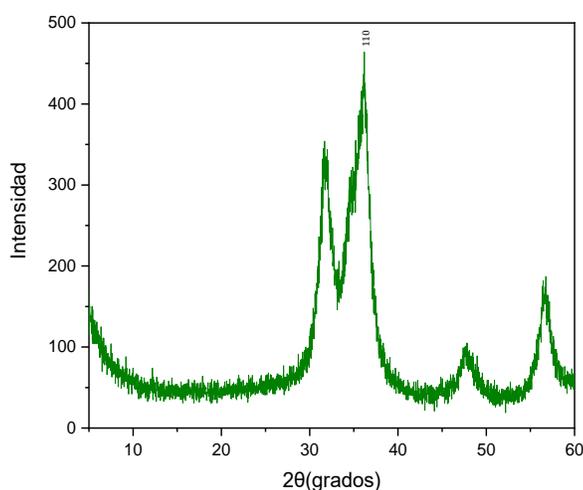


**Figura 13.** Representación de la distancia del plano 003 con el cual se obtiene la distancia interlamina (Santana, 2014).

### 7.1.1.1 Espectro de difracción del material *HDL – (O)*

El proceso de síntesis del material *HDL-(O)* no finaliza como un hidróxido doble laminar completo, sino como óxidos mixtos listos para ser reconstruidos a un HDL, debido al proceso térmico que se ve implicado y al combustible agregado, en este caso sacarosa.

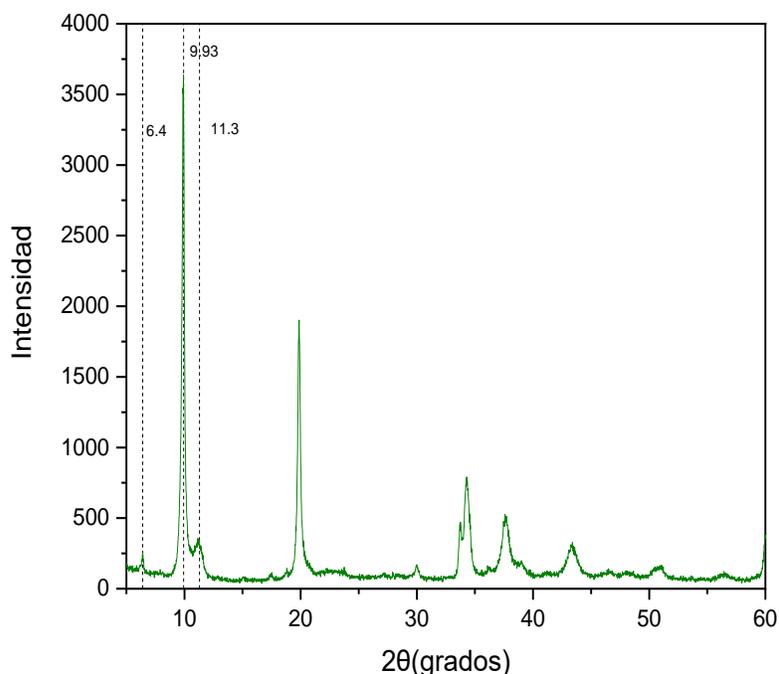
La relación del tamaño de partícula está asociada con el plano 110 (Miao et al., 2009) (**Figura 14**), teniendo en consideración los anteriores datos podemos obtener el tamaño de cristal del material *HDL-(O)*; 3.97 nm, en contraste con el tamaño relativo del cristal del híbrido *HDL-T* obtenido a base del material *HDL-(O)* es de 8.85 nm, se observa un incremento en su tamaño al ser reconstruido.



**Figura 14.** La intensidad del pico con el plano 110 del gráfico es indicativo de la formación de óxidos mixtos o material  $ZnO/Al_2O_3$  (Miao et al., 2009).

### 7.1.1.2 Espectro de difracción del material *HDL-NO<sub>3</sub>*

En la gráfica de la **Figura 15** se muestra el difractograma obtenido en el análisis correspondiente a difracción de rayos X para la identificación de la formación del *HDL-NO<sub>3</sub>*. El pico de mayor intensidad en la región  $2\theta$  de  $9.93^\circ$  está relacionada al plano 003 y corresponde a la formación del HDL con los nitratos intercalados en su región interlaminar lo que nos indica una correcta síntesis con pocas impurezas de carbonatos derivados de la atmosfera.

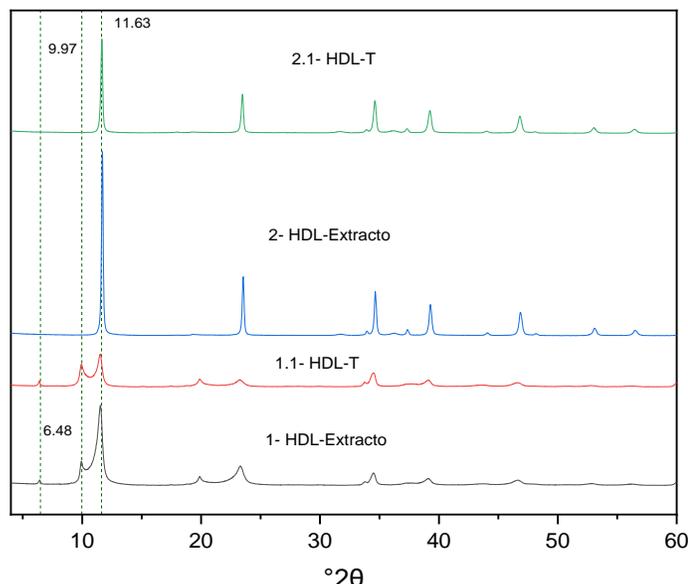


**Figura 15.** Gráfica del difractograma correspondiente al espectro de difracción de rayos X del material *HDL-NO<sub>3</sub>*.

### 7.1.1.3 Espectros de difracción de los materiales híbridos

Los materiales híbridos al ser analizados a través de difracción de rayos X fueron identificadas las moléculas o aniones intercalados en la región interlaminar y así mismo observarse la formación de algún otro tipo de compuesto; los materiales híbridos provenientes de *HDL-NO<sub>3</sub>* (ruta de intercambio iónico) mostraron un comportamiento similar en la gráfica representativa de los espectros de difracción de rayos X, ( **Figura 16**), (1 *HDL-Extracto* y 1.1 *HDL-T*); se observa que la estructura *HDL-NO<sub>3</sub>* original permanece en menor medida, siendo representativa de esta el plano 003 del ángulo  $2\theta$  igual a  $9.97^\circ$  y con espacio basal de  $8.86 \text{ \AA}$  calculado mediante la ley de Bragg, así mismo se observa una captación de  $\text{CO}_2$  en gran escala, siendo representativo en su forma de carbonatos  $\text{CO}_3$  en el ángulo  $2\theta$  de  $11.63^\circ$  y el espacio basal del mismo (plano 003), fue de  $7.59 \text{ \AA}$ , calculado por la ley de Bragg y confirmando esa presencia de  $\text{CO}_3$  (JCPDS 022-0700), (Bernardo et al., 2018; Wan et al., 2015). El espectro muestra un ligero pico en el ángulo  $2\theta$  de  $6.48^\circ$  muy probablemente ligera intercalación del timol para ambos casos, la escasa intercalación es debido a una falta de involucración del timol, es posible la formación de sus sales y precipitado de ellas lo que limita la intercalación, el espacio basal en este caso es de  $13.63 \text{ \AA}$ , un aumento en tamaño y disminución en el ángulo  $2\theta$ , esto debido al mayor tamaño molecular del timol.

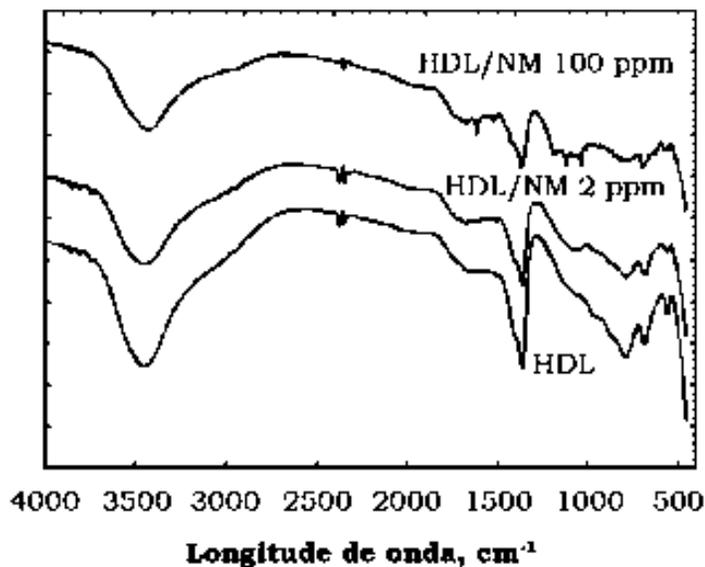
Los materiales (2 HDL-Extracto y 2.1 HDL-T) muestran una buena cristalización debido a la intensidad del plano 003 representado en el ángulo  $2\theta$  de  $11.63^\circ$ , estos materiales provenientes de la ruta de reconstrucción de los óxidos mixtos no presentan nitratos debido al proceso, sin embargo, su estructura se reconstruyó 100% con carbonatos provenientes del  $\text{CO}_2$  atmosférico, las muestras pueden ser identificadas como hidróxidos dobles laminares  $\text{ZnAl}$  (JCPDS 022-0700), el espacio basal del plano 003 fue de  $7.59 \text{ \AA}$ , para ambos compuestos, calculado por la ley de Bragg, lo que corresponde a valores típicos reportados para los  $\text{HDL-CO}_3$ , (Bernardo et al., 2018; Wan et al., 2015). Por otra parte, no hay plano que manifieste la presencia de timol.



**Figura 16.** Gráfica de los difractogramas de los materiales híbridos

### 7.1.2 Espectroscopía IR característica de los HDL

Las bandas de vibración características de los DHL están en las longitudes de onda debajo de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  que son característicos del anión intercalado carbonatos y/o nitratos y que la intensidad se ve afectada de acorde a la concentración intercalado en contraste con alguna otra molécula (**Figura 17**).

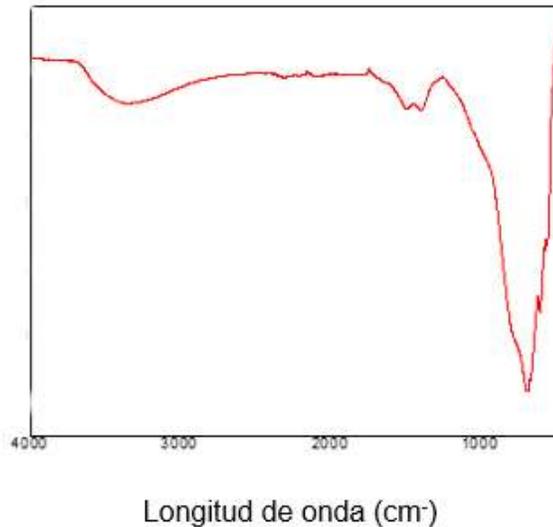


**Figura 17.** Gráfica correspondiente a los espectros IR característicos de HDL en contraste con intercalaciones de naranja de metilo. Fuente; (Ramírez Llamas et al., 2015).

#### 7.1.2.1 Espectroscopía IR del material *HDL-(O)*

Los óxidos mixtos fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) para identificar vibraciones correspondientes a las bandas Oxígeno-metal (**Figura 18Error! Reference source not found.**).

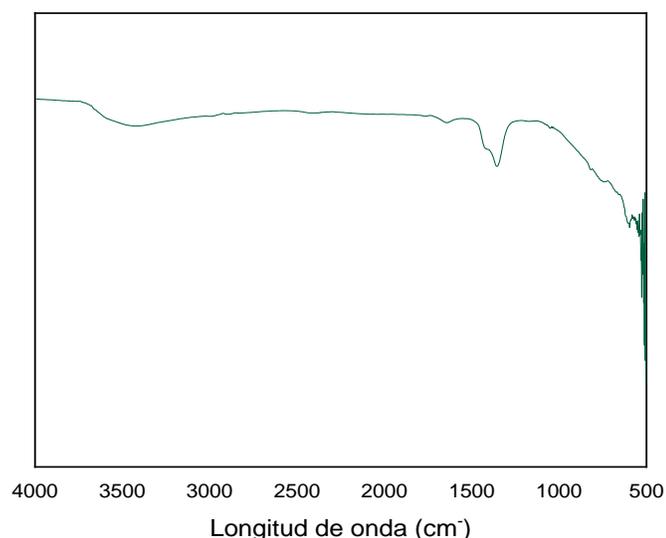
La aparición de bandas relacionadas con las vibraciones de elongación de enlaces C-C o C=O, rango de 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$ , son indicio de la presencia de impurezas provenientes de restos carbonosos provenientes de la sacarosa que no se lograron remover con el tratamiento térmico.



**Figura 18.** Gráfica representativa del espectro IR del material HDL(O), la banda más ancha de absorción en la región de 500 a 600  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de los enlaces metálicos  $\text{ZnO}/\text{Al}_2\text{O}_3$  (Klopprogge et al., 2004).

#### 7.1.2.2 Espectroscopía IR del material HDL- $\text{NO}_3$

En la gráfica de la **Figura 19** se observa el espectro IR obtenido en el análisis de espectrofotometría IR por transformada de Fourier correspondiente al material sintetizado por la ruta de hidrólisis de urea, los resultados obtenidos en difracción de rayos X y en complemento con los de IR podemos comprobar con base en ellos que el material se sintetizó de manera correcta ya que ambos espectros son característicos de estos materiales, se puede observar que el material alberca cantidades mínimas de moléculas de agua en su región interlaminar debido a la poca absorbancia en la región de  $3500 \text{ cm}^{-1}$  de la misma manera podemos observar poca absorbancia en la región debajo de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  que es característica de los materiales HDL y su baja intensidad pudiera significar baja concentración en la técnica del análisis.

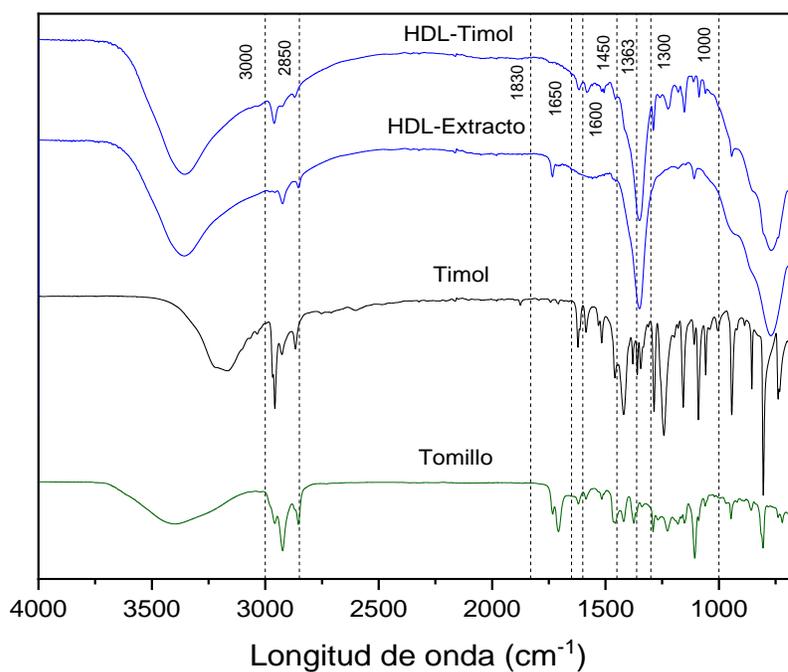


**Figura 19.** Gráfica correspondiente al espectro de IR del material *HDL-NO<sub>3</sub>*

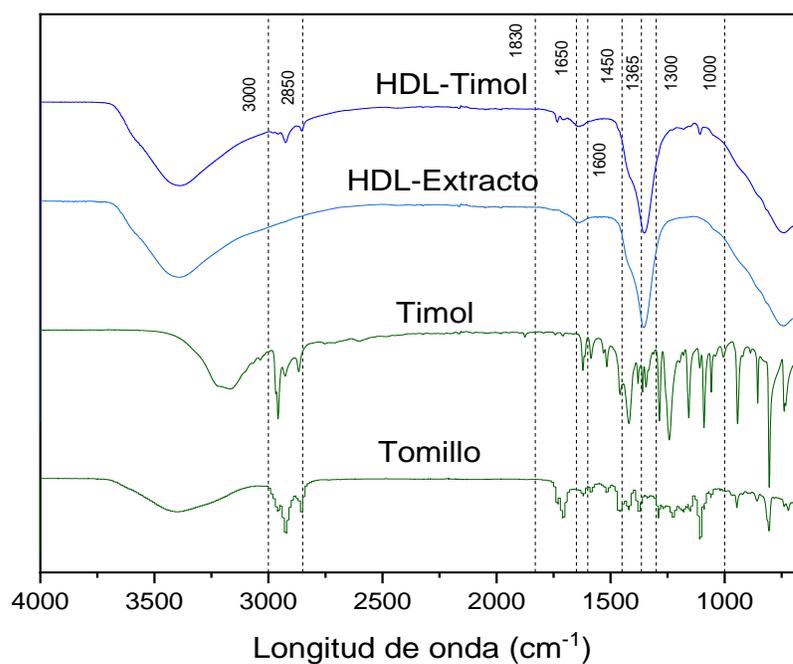
### 7.1.2.3 Espectroscopía IR de los materiales híbridos

En las gráficas de la **Figura 20** y **Figura 21** se muestran los espectros de infrarrojo obtenidos de los materiales híbridos, en las dos distintas rutas empleadas para su síntesis y en comparativa con el extracto de tomillo y timol puro.

La longitud de banda características del tomillo y el timol están ampliamente identificados, con lo cual será de guía para identificarlos en los compuestos híbridos; en el rango de 3000 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  es característico de los polifenoles, un estiramiento  $O-H$ , en el rango de 3000 y 2850  $\text{cm}^{-1}$  es característico de las vibraciones correspondientes al estiramiento  $C-H$  de metilos y metilenos (Reina et al., 2016), y esta región es de las más importantes para identificar en los materiales híbridos. En la región de 1600 $\text{cm}^{-1}$ , representa a  $C=C$  del anillo aromático. En la región de 1380  $\text{cm}^{-1}$  es representativa de los grupos Isopropilos, la región de huella dactilar se encuentra desde 700 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  y hay una fuerte interacción entre enlaces vecinos y la constitución química de la o las moléculas, dan cambios importantes en los picos de absorción (Guillén et al., 2010; Reina et al., 2016), con estos datos podemos hacer identificación de la molécula de interés (timol) en un HDL.



**Figura 20.** Gráfica correspondiente al espectro IR de los materiales híbridos sintetizados por la ruta de reconstrucción partiendo de combustión de un HDL en contraste con los espectros de timol y tomillo.



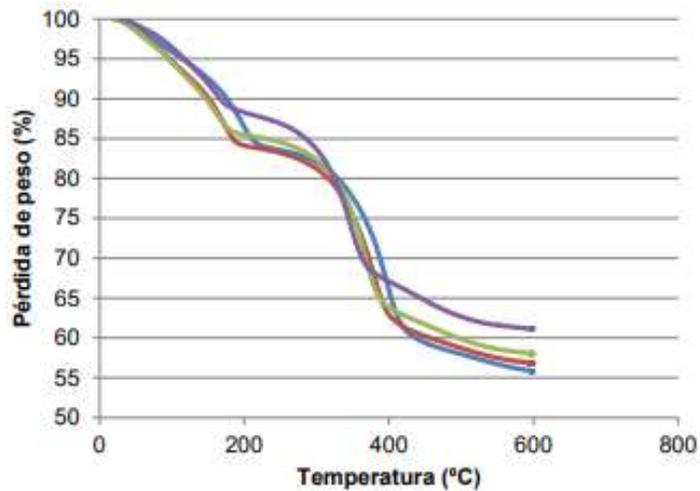
**Figura 21.** Gráfica de los espectros IR correspondientes a los híbridos obtenidos por la ruta de intercambio iónico en comparativa con los espectros del timol y el extracto de tomillo.

En el rango de 2850 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  de longitud de onda representa a los estiramientos asimétrico y simétrico de  $C-H$  correspondientes a los grupos metilo y metileno, en el

rango de 1650 y 1830  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a los grupos carbonilo C=O, debido a posibles flavonoides, en el rango de 1450 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a C=C del anillo aromático del timol, también conocido como huella dactilar en ese rango, en la región de 1000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  se consideran como vibraciones desconocidas (Adinew, 2014; Guillén et al., 2010; Larrea et al., 2018; Reina et al., 2016; Wu et al., 2012). Mostrándose esas vibraciones en los materiales híbridos, pero con una mayor intensidad con respecto a la huella dactilar del timol en el material HDL – *Timol*, proveniente del método combustión o ruta derivada de la combustión y posterior reconstrucción, donde se utilizó timol puro para su síntesis con respecto al material HDL – *Extracto* derivado del mismo método que muestra una intensidad alta en la región correspondiente a los flavonoides debido a que el extracto de tomillo contiene una mezcla de muchos compuestos entre ellos están estos. En contraste con los espectros IR de los materiales híbridos obtenidos por la ruta de intercambio iónico donde evidentemente en la región de huella dactilar reportada en la literatura se hace presente de manera muy tenue, se puede aludir a muy poca intercalación o impregnación de timol. Por otra parte, las bandas de absorción intensas en 1365  $\text{cm}^{-1}$  o cercanas a las bandas de absorción en esa zona, corresponden a los aniones que conforman los HDL, en este caso  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  o una mezcla de ambos (Santana, 2014), reafirmando la correcta reconstrucción laminar o correcta síntesis de HDL y por último las bandas de absorción más anchas en los rangos de 3000 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a grupos O-H de la absorción del agua y O-H atribuibles a los HDL, en el caso del extracto y el timol corresponde a los estiramientos O-H de polifenoles o grupos fenólicos (Lobo-Sánchez et al., 2018; Rocha Oliveira et al., 2015).

### 7.1.3 Termogramas característicos de los HDL

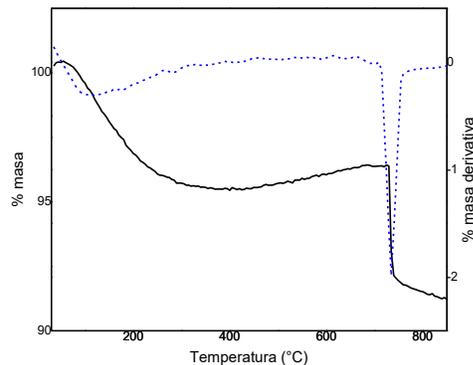
Los HDL muestran de manera general eventos característicos en su descomposición por acción térmica (**Figura 22**), estos eventos en el termograma característico representa la pérdida de agua fisisorbida y la descomposición de la estructura laminar.



**Figura 22.** Gráfica de los termogramas característicos de distintos HDL, se aprecia la pérdida de agua en el evento de 100 a 200 °C, la demás pérdida de peso corresponde a la descomposición laminar y rompimiento de enlaces metálicos. Fuente; (Fernández, 2016).

### 7.1.3.1 Termograma del material HDL-(O)

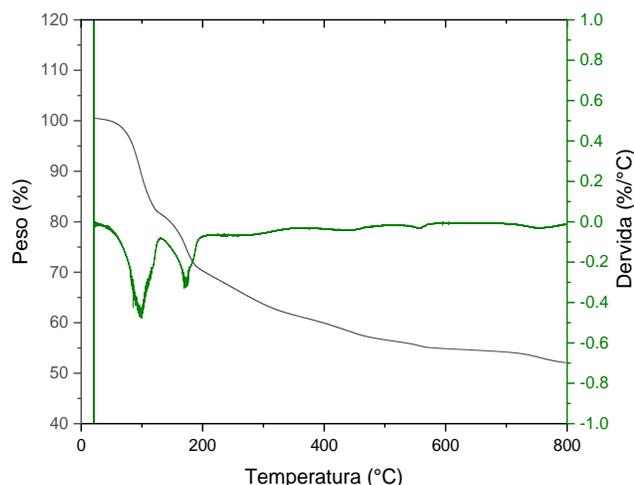
En el termograma de la **Figura 23**, se observan dos pérdidas importantes de masa: una de aproximadamente 5 % a 100 °C, correspondiente a la pérdida del agua adsorbida en el sólido de óxido mixto, y otra del 5 % a 735 °C, que se asocia a la descomposición de este. En la literatura se reporta la descomposición del óxido de zinc a aproximadamente 300 °C, por lo que se relaciona el incremento de la estabilidad térmica a la adición de *Al* a esta solución sólida, lo que indica que el *Al* le da el doble de capacidad calorífica generando una gran estabilidad ante las temperaturas elevadas.



**Figura 23.** Gráfica del análisis TGA para el material HDL-(O), mostrando pérdidas totales de masa cercano al 10% en su descomposición debido a la temperatura.

### 7.1.3.2 Termograma del material híbrido *HDL-T*

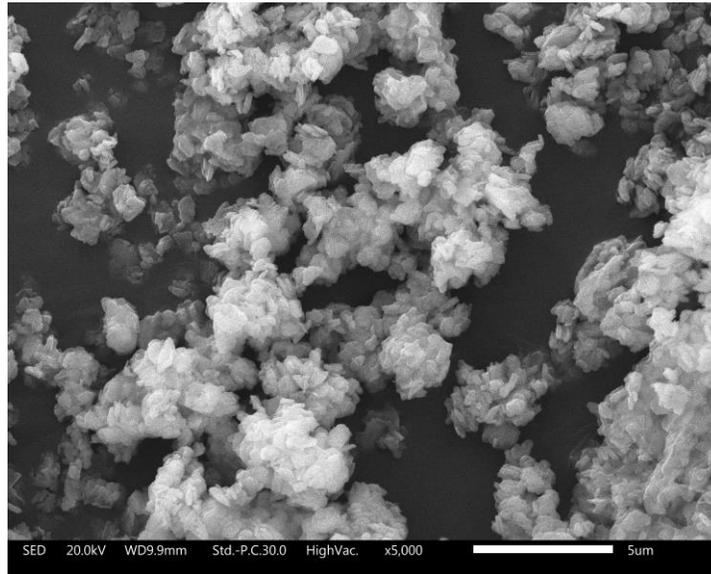
En la gráfica de la **Figura 24** se muestra el termograma del análisis TGA correspondiente al material híbrido *HDL-T* proveniente del *HDL-(O)*, se evidencia la pérdida de peso de hasta un 30% aproximado en el rango de 100 °C a 230°C, es muy probable que sea debido a agua fisisorbida, en primera instancia y a la molécula orgánica de timol en la región cercana a 230 °C, el porcentaje en peso continuó disminuyendo de forma constante hasta llegar a una pérdida más por arriba del 10%, sin embargo, comparado con el termograma del material *HDL-(O)* es evidente que el material reconstruido en su estructura laminar HDL pierde un alto porcentaje en peso comparado con el óxido mixto, esto debido a que por efectos de la temperatura el material vuelve a formas de óxido mixto *HDL(O)*. Por otra parte, la molécula orgánica de timol sigue conservando sus características de punto de ebullición de 230 °C reportado, debido al comportamiento de la gráfica se puede deducir esto.



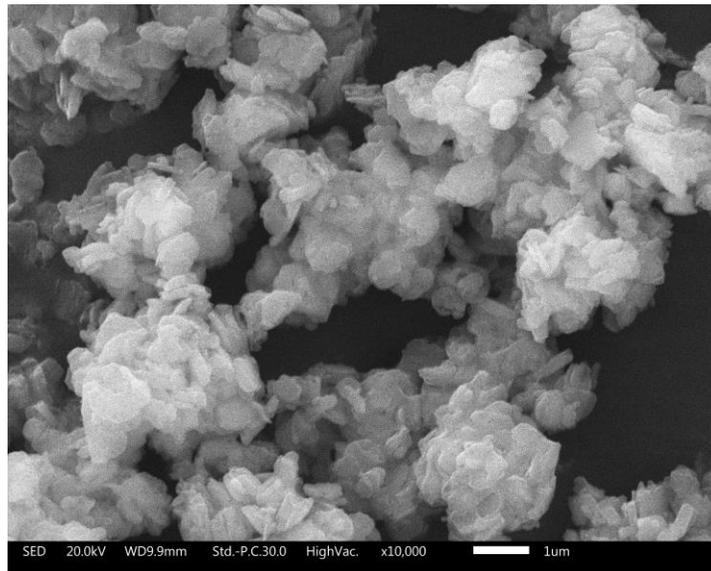
**Figura 24.** Gráfica del análisis TGA correspondiente al híbrido HDL-T.

### 7.1.4 Análisis de la morfología del material híbrido *HDL-T*

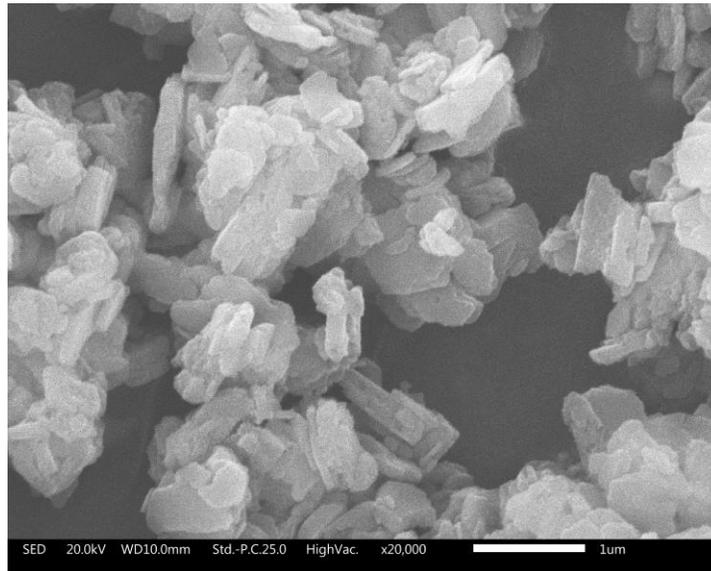
La morfología del material híbrido *HDL-T* obtenido por la ruta de reconstrucción se puede observar en la **Figura 25**, **Figura 26**, **Figura 27** y **Figura 28** su estructura cristalina es evidente al igual que la formación de las láminas características, la coloración grisácea en algunas regiones de los cristales es debido a los carbonos de las moléculas de timol impregnadas, con lo que se corrobora la presencia de estas moléculas orgánicas.



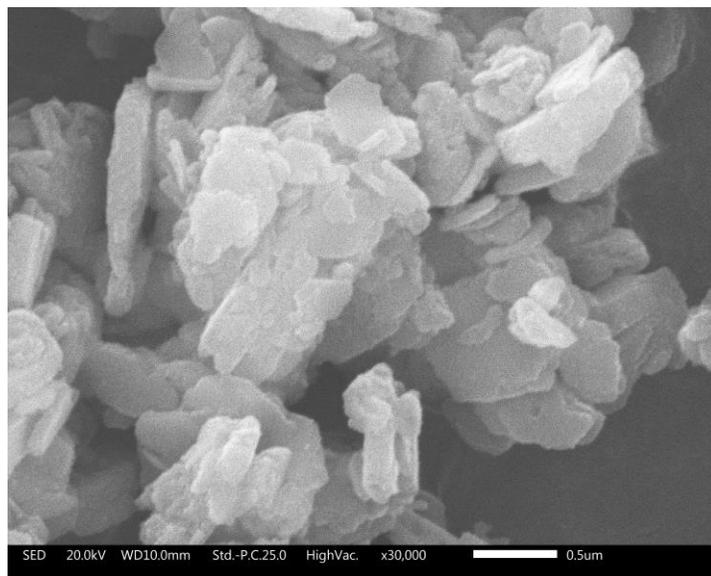
**Figura 25.** Morfología del material HDTL-T a x5,000 derivado de la ruta de reconstrucción, aglomeraciones cristalinas.



**Figura 26.** Morfología del material HDTL-T a x10,000 derivado de la ruta de reconstrucción.



**Figura 27.** Morfología del material HDTL-T a 20,000 derivado de la ruta de reconstrucción, grandes láminas cristalinas, regiones grisáceas.



**Figura 28.** Morfología del material HDTL-T a x30,000 derivado de la ruta de reconstrucción, se alcanzan a observar los planos de las láminas cristalinas.

#### 7.1.4.1 Análisis elemental (EDS) de HDL-T

La espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) permitió analizar la caracterización elemental del material HDL-T (Ruta de reconstrucción), se corroboró la presencia de carbono derivado de los compuestos orgánicos (timol) hasta en un 21.4%, sin embargo, parte de ese carbono pertenece a los carbonatos intercalados. Por otra parte, la relación  $Zn^{+2}$  y  $Al^{+3}$  presente fue de 1.5, la relación inicial en la síntesis de óxido

mixto (HDL-(O)), fue de 2, (Figura 29), sin embargo, la pérdida en la relación pudo a ver sido debido al proceso de síntesis térmico y al proceso de reconstrucción donde se pudo haber perdido cierta cantidad de los elementos.

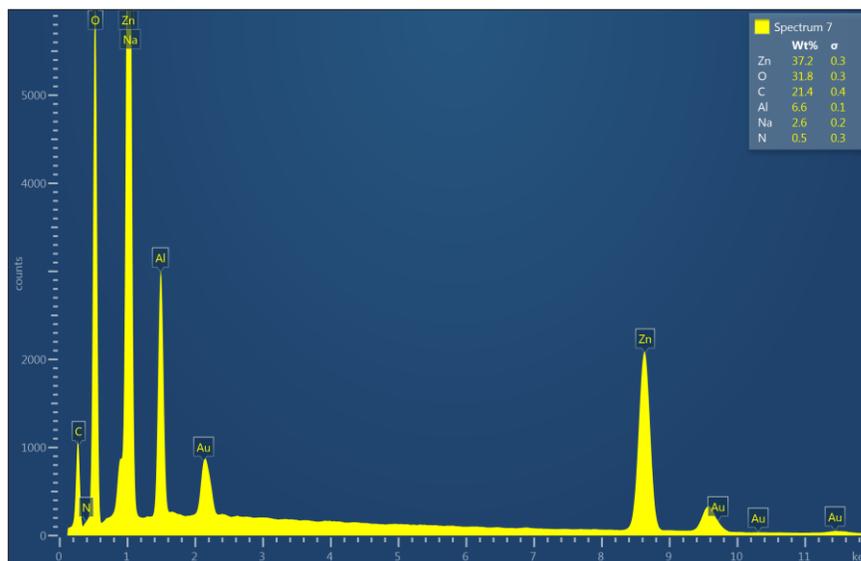


Figura 29. Análisis elemental del HDL-T obtenido por la ruta de reconstrucción.

## 7.2 Actividad antifúngica

Los materiales evaluados contra los hongos fitopatógenos una vez obtenidos los datos se les hizo un análisis estadístico de diferenciación, lo que permite analizar datos numéricos de manera objetiva y análisis subjetivo a través de observaciones visuales.

### 7.2.1 Pruebas *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides*

En la **Tabla 5** y **Tabla 6** se muestran los promedios obtenidos en las mediciones del crecimiento radial pasadas 96 h de incubación, las mediciones radiales se hicieron por cuadruplicado en distintas zonas de la caja Petri y se promediaron y se obtuvo la media de estos.

**Tabla 5.** Inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* por el material híbrido proveniente del método de reconstrucción.

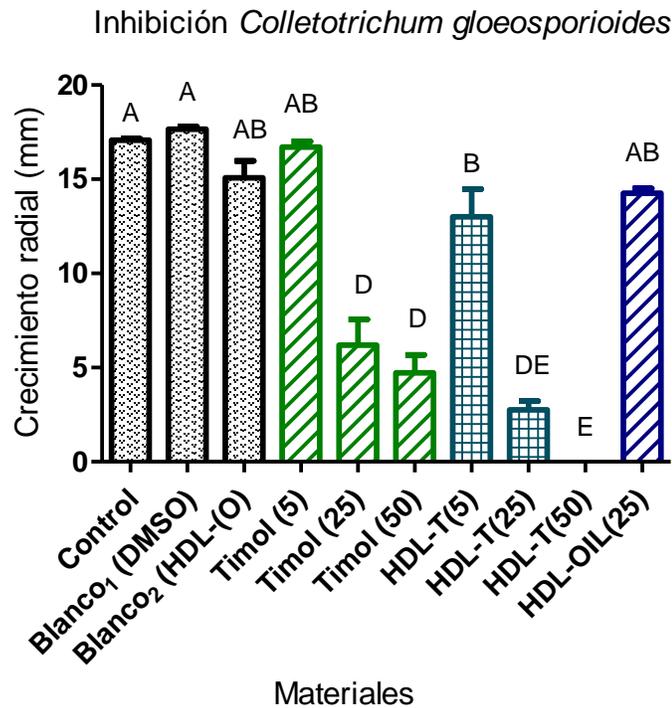
Material	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Crecimiento radial (mm)				$\bar{x}_t$
		$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_3$	$\bar{x}_4$	
Control	-	17	17	17.33	17	17.08
Blanco <sub>1</sub> (150 $\mu$ L DMSO)	50	17.66	17.33	18	17.66	17.66
Blanco <sub>2</sub> (HDL – O)	50	17.33	13	15	15	15.08
Timol en solución	5	16.3	16.6	16.3	17.6	16.62
	25	6.6	9.6	5.6	3	6.2
	50	3.3	3	5.6	7	4.72
HDL – Extracto	-	-	-	-	-	-
	25	14	14	15	14	14.25
	-	-	-	-	-	-
HDL – T	5	16	9	13	14	16.3
	25	2	2	4	3	2.75
	50	-	-	-	-	-

**Tabla 6.** Comparativa de la inhibición del material híbrido por el método de reconstrucción contra el método de intercambio iónico

Material	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Crecimiento radial (mm)				$\bar{x}_t$
		$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_3$	$\bar{x}_4$	
Control	-	16	16	16	16	16
Blanco <sub>1</sub> (134 mL de DMSO)	-	10	12	11	13.5	11.62
Blanco <sub>2</sub> (HDL – NO <sub>3</sub> )	25	15	15	16	12	14.5
Timol	25	6.6	9.6	5.6	3	6.2
HDL – T (Reconstrucción)	25	2	4	2	3	2.75
HDL – T (Intercambio iónico)	25	14	12	13	13	13

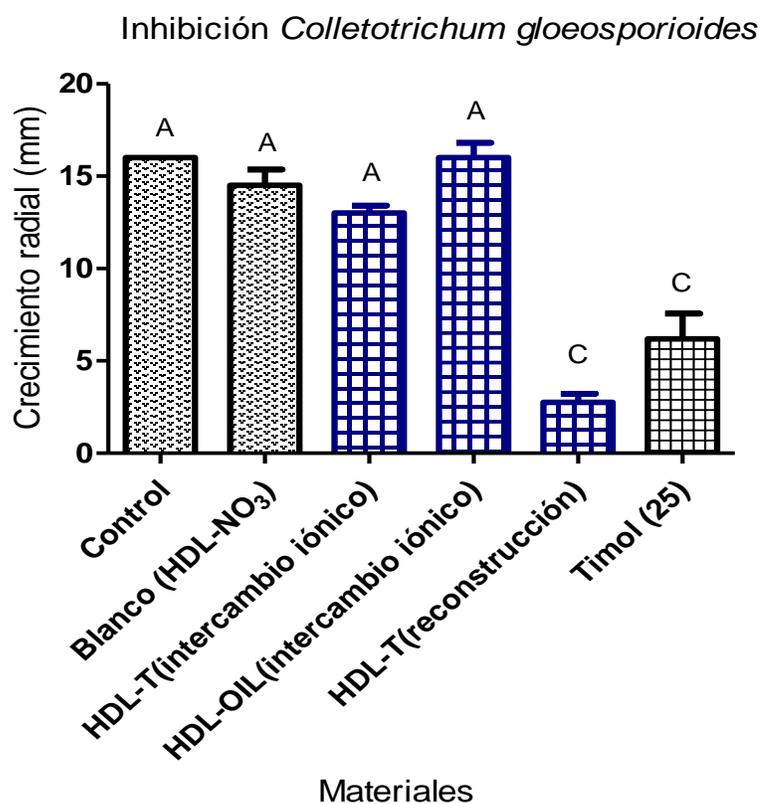
<b>HDL – Extracto</b> (Intercambio iónico)	25	16	18	14	16	16
---	----	----	----	----	----	----

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa GraphPad Prism para saber si hay diferencias significativas entre los distintos crecimientos radiales del hongo comparando el control con las demás condiciones. En las gráficas de la **Figura 30** y **Figura 31** se muestran dichos análisis.



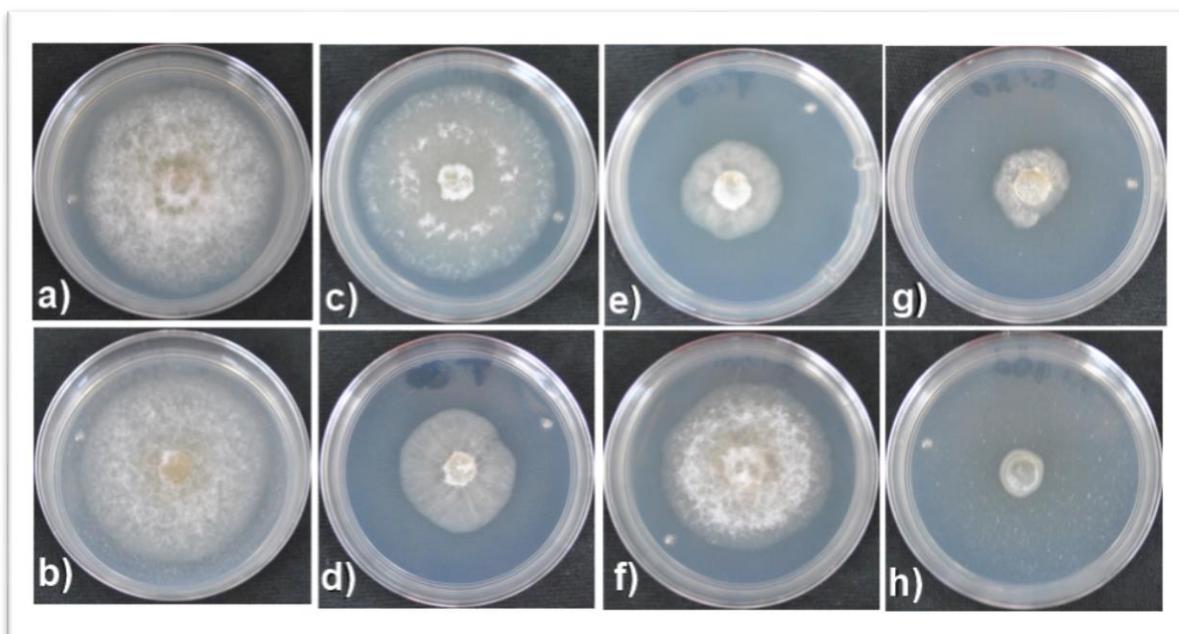
**Figura 30.** Gráfica representativa de la inhibición de los materiales híbridos derivados de la reconstrucción de la combustión contra *Collectotrichum gloeosporioides*.

La gráfica de la **Figura 30** muestra la diferencia entre cada material contra el hongo en contraste con el control y el blanco, las letras por encima de cada columna indican la diferencia significativa y la similitud en el crecimiento del hongo, por ejemplo; el sistema estadístico muestra que el control, los blancos, el timol y el material a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  no tienen diferencia en el crecimiento por lo que se deduce que no hubo inhibición del crecimiento radial.



**Figura 31.** Gráfica representativa en la inhibición del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* ante los materiales híbridos obtenidos de la ruta de intercambio iónico en contraste con el híbrido obtenido de la reconstrucción.

Las gráficas de la **Figura 30** y **Figura 31** muestran la eficacia del material híbrido *HDL-T* obtenido por el método de reconstrucción para la inhibición del hongo fitopatógeno, los valores numéricos delante del nombre de cada compuesto en las gráficas hacen referencia a la concentración en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , así mismo se observa un efecto fungistático muy eficaz a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  para el caso del híbrido *HDL-T* obtenido por la ruta de reconstrucción y el timol puro, sin embargo, el análisis subjetivo también muestra una diferencia en el comportamiento del hongo respecto del control contra el atacado con los materiales, (**Figura 32**).



**Figura 32.** Efecto fungistático de los materiales contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

En la **Figura 32** se observa una diferencia notable entre las distintas placas, no solo en el tamaño del crecimiento radial del hongo sino también en la pigmentación y aspecto de las hifas, a) control muestra su crecimiento normal, bien desarrollado y en la etapa de maduración máxima, b) el blanco con el *HDL-(O)* muestra un desarrollo semejante al control. c), d) y e) corresponden a las diluciones de timol puro a 5, 25 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respetivamente, la inhibición es notoria para cada concentración, sin embargo, el hongo se vuelve más estresado desde la primera placa limitándose a producir poco micelio aéreo y de manera similar f), g) y h) que corresponden a los tratamientos con el *HDL-T* método de reconstrucción a 5, 25 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , impidieron el desarrollo de hifas y micelio aéreo además de provocar estrés en el hongo.

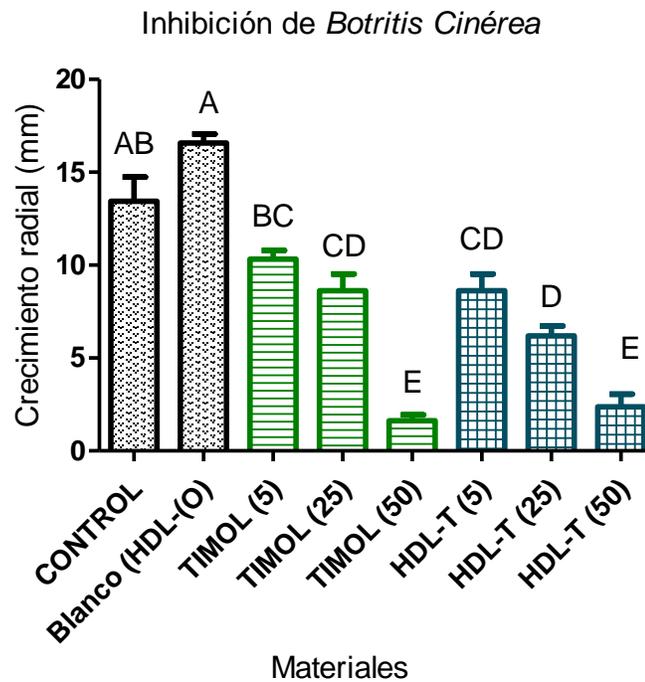
### 7.2.2 Pruebas in vitro contra *Botritis Cinérea*

En la **Tabla 6** se muestran los resultados obtenidos contra *Botritis cinérea*, al observar que el material híbrido derivado de la ruta de reconstrucción fue eficaz en la inhibición de su homólogo *Colletotrichum gloeosporioides* se eligió este para hacer las pruebas contra este diferente hongo. A diferencia de *Colletotrichum gloeosporioides*, el crecimiento exponencial fue a las 48 horas de poner el experimento en la cámara de crecimiento.

**Tabla 6.** Inhibición del crecimiento radial de *Botritis cinérea* por la acción de los materiales

Material	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Crecimiento radial (mm)				
		$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_3$	$\bar{x}_4$	$\bar{x}_t$
Control	-	17.25	12.75	12.25	11.5	13.375
Blanco (HDL - (0))	50	17	17.5	15.25	16.58	16.58
Timol	5	11	11	10.3	9	10.32
	25	9.25	6.5	8	10.75	8.62
	50	2.5	1	1.5	1.5	1.62
HDL - T (Reconstrucción)	5	6.25	8.25	10	10	8.62
	25	5.25	5.75	6	7.75	6.18
	50	2.75	2.5	3.75	0.5	2.37

De la misma manera en la gráfica de la **Figura 33** se muestra el análisis estadístico en el programa GraphPad Prism.



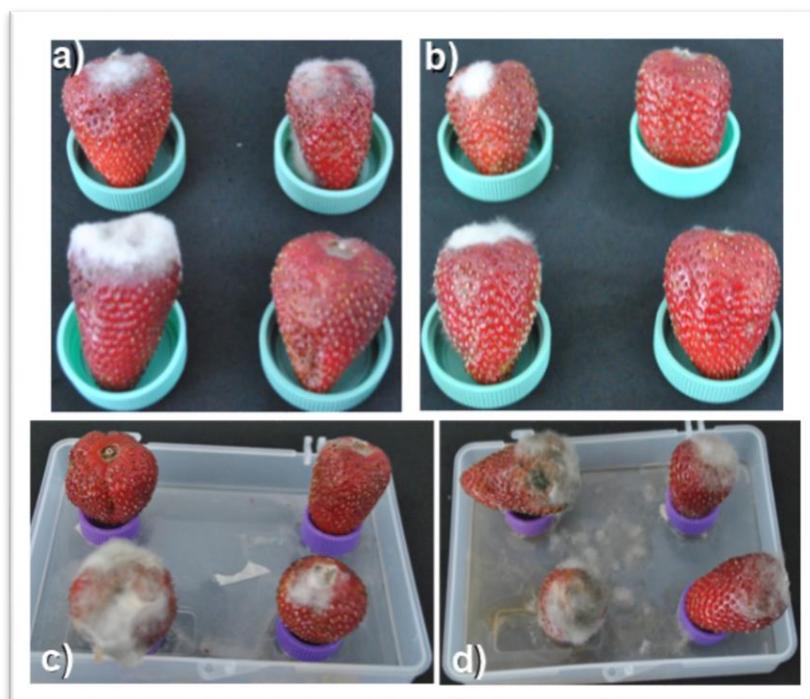
**Figura 33.** Gráfica representativa de la inhibición del hongo *Botritis cinérea* ante los materiales.

En la gráfica se puede observar una diferencia significativa en el crecimiento radial del hongo respecto al control y el blanco en comparativa con el material híbrido y las soluciones de timol puro, el comportamiento fue muy similar entre el híbrido y el timol puro indicando que la matriz conserva la eficacia del timol.

### 7.2.3 *Botritis* contra fresas, híbrido contra *Botritis*

La descomposición de la materia orgánica es inevitable, los alimentos tienen su vida de anaquel y está determinado por el tiempo y las condiciones de la atmósfera del ambiente, sin embargo, son esas condiciones del ambiente las que determinan su durabilidad, las condiciones del ambiente pueden ser manipuladas por la acción humana o introducir nuevas condiciones materiales al sistema, partiendo de esto los materiales híbridos pueden ser una de esas condiciones extras que ayuden a alargar la vida de anaquel de alimentos perecederos, ya que no solo los alimentos se ven afectados en el huerto por hongos y bacterias, sino que en el proceso de logística del mercado son aún vulnerables y la alarma de pérdidas económicas y daños sanitarios continúan antes de ser consumidos.

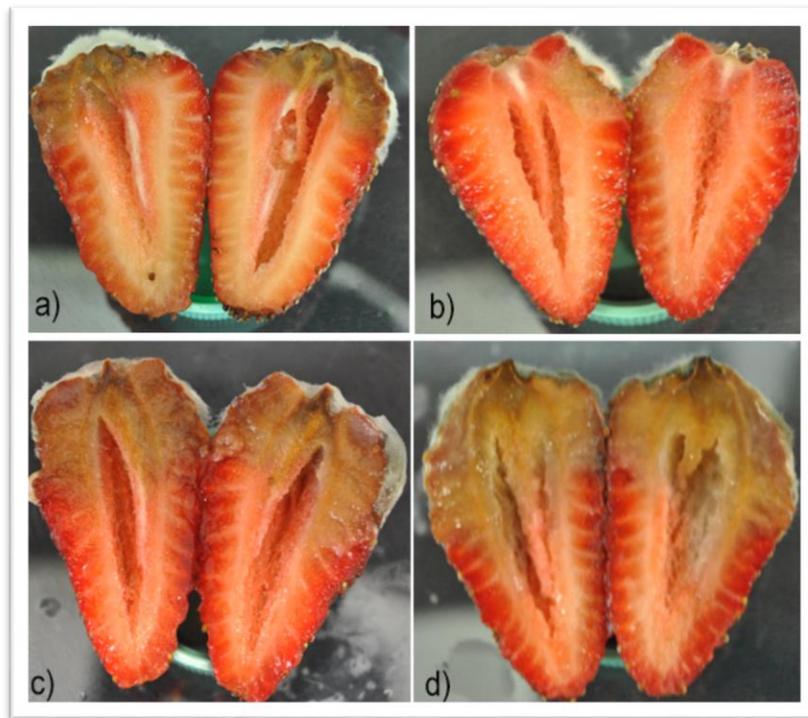
Los resultados obtenidos in vivo sobre el material híbrido y su acción protectora ante las fresas del moho gris están mostrados en la **Figura 34**, podemos observar la evidente descomposición potencial en el control y un retraso considerable en las fresas tratadas con el timol puro y con el material híbrido derivado de la ruta reconstrucción, visualmente el moho gris es más evidente en el control, el aroma y la consistencia de las fresas también fue más notable su degeneración en el control al transcurrir 120 horas de la inoculación con el hongo *Botritis cinérea*.



**Figura 34.** Inhibición de *Botrytis cinérea* accionando en fresas bañadas con solución del material híbrido y timol puro.

Es evidente la acción protectora del híbrido contra *Botrytis cinérea* **Figura 34**, a) material híbrido *HDL-T* a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , b) réplica del material híbrido, c) solución de timol puro a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y d) control. Evidentemente las fresas sin ningún tratamiento se descomponen más rápido por la acción de *Botrytis cinérea* llevándolas a generar el mencionado moho gris y abundante micelio aéreo.

Las fresas fueron partidas a la mitad para observar los daños internos, el hongo como dicta la literatura penetra los frutos por el pedúnculo por lo que se pudo observar el daño desde esa área de las fresas (**Figura 35**). De igual forma el daño se observa con mayor intensidad en la fresa control.



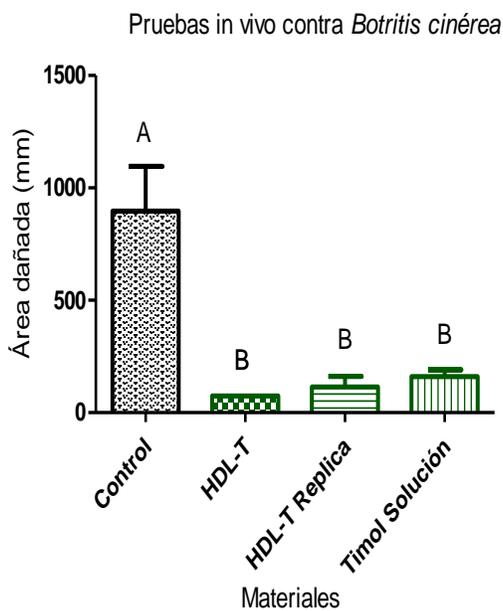
**Figura 35.** Efecto de la pudrición interna de fresas debido al hongo *Botritis cinérea*.

Fresas partidas atacadas por el hongo fitopatógeno **Figura 35**, a) tratada con *HDL-T* a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , b) tratada con *HDL-T* a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  (replica), c) tratada con timol en solución  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , d) fresa control

Debido a que las distintas fresas a los diferentes tratamientos se comportaron de manera no similar, se midió el área de daño interno con el programa ImageJ, y se obtuvo el promedio para cada tratamiento **Tabla 7** y **Figura 36**.

**Tabla 7.** Inhibición del daño interno en fresas por *Botritis cinérea* debido a la acción de los materiales.

	Áreas dañadas (mm)			
	Fresa 1	Fresa 2	Fresa 3	Promedio
Control	897	1240	555	897
HDL-T	74.4	74	74	222
HDL-T Replica	196	33.4	114	114
Timol Solución	160	212	108	480



**Figura 36.** Gráfica de las áreas dañadas por la descomposición interna en las fresas debido al hongo *Botritis Cinérea*, las fresas tratadas a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  tuvieron un promedio menor de descomposición interna.

### 7.3 Análisis de conservación de timol

Las alícuotas fueron tomadas como se indica en el desarrollo experimental de las placas Petri de pozos (Figura 37). y posteriormente analizados los datos arrojados por el HPLC.



**Figura 37.** Representación de las pruebas en pozos Petro para el análisis en HPLC.

En la Figura 37 se ilustra la representación de las pruebas en pozos Petri para el análisis en HPLC, en la parte superior está el preparado de agar con  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de material híbrido obtenido por el método de reconstrucción derivado de combustión, de la misma manera en la parte inferior esta esa misma concentración, pero inoculado con el hongo *Botritis cinérea*, la misma réplica se realizó con timol puro, los orificios son debido a las alícuotas tomadas para la experimentación descrita en el desarrollo experimental.

#### 7.3.1 Conservación- descomposición de timol

Los datos arrojados por el HPLC están presentados en la Tabla 8, el timol se descompone a compuestos secundarios por la acción bioquímica del hongo, además de la pérdida de este por su característica volátil, el material híbrido conserva más tiempo al timol evitando en gran medida la pérdida debido a su característica volátil, sin embargo, cuando existe acción del hongo *Botritis cinérea*, la descomposición del timol es similar si se encuentra solo o como híbrido. Para las muestras de timol y el híbrido pasadas 72 horas ( $T_1$ ) sin acción del hongo, hay una diferencia de 19.3% de pérdida de timol, teniendo mayor estabilidad el timol en forma de híbrido, ( $HLD - T$ ), sin embargo, no hay diferencia significativa cuando la acción del hongo está presente.

**Tabla 8.** Disminución del area bajo la curva (cm<sup>2</sup>) en el análisis HPLC a los tres distintos tiempos (T) 0, 72 y 120 horas y el % de pérdida de timol.

Muestra sin hongo	Área T <sub>0</sub>	Área T <sub>1</sub>	Área T <sub>2</sub>	% de pérdida
Timol	153,941	93,533	53256	65.4
HDL-T	200,592	160,652	133829	33.28
Muestra con hongo				
Timol	153,941	104,295	8,518	94.4
HDL-T	200,592	102,657	12,916	93.5

## 8 Conclusiones

- ✓ El material híbrido sintetizado mostró una mayor conservación de la molécula biológicamente activa (timol) y conservo sus características fungistáticas.
- ✓ El aroma característico del timol disminuyó en el material híbrido indicando el detenimiento de su volatilidad, dándole una mayor facilidad de manejo para posibles desarrollos de fungicidas y facilidad de aplicación.
- ✓ El timol se descompone de la misma manera como híbrido que como timol puro ante la acción bioquímica del hongo sin perder acción fungistática, pero a la vez evitando dejar residuos de timol que pudieran dañar a hongos benéficos lo que lo hace un fungicida amigable con el ambiente.
- ✓ La matriz HDL compuesta con *Zn/Al* ayuda en la nutrición de la planta debido a que estos metales las plantas los utilizan en su alimentación.
- ✓ Un material híbrido partiendo de la matriz HDL e impregnado de timol no solo pudiera tener aplicación como fungicida ecológico, sino que también como un conservador alimenticio, abriendo la puerta a futuras investigaciones.

## 9 Referencias

- Adinew, B. (2014). GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from cinnamon bark growing in South-west of Ethiopia. ~ 75 ~ *International Journal of Herbal Medicine*, 1(6), 22–31.
- Aisawa, S., Takahashi, S., Ogasawara, W., Umetsu, Y., & Narita, E. (2001). Direct intercalation of amino acids into layered double hydroxides by coprecipitation. *Journal of Solid State Chemistry*, 162(1), 52–62. <https://doi.org/10.1006/jssc.2001.9340>
- Alfaro-Espino, E., Morales-García, J. L., Pedraza-Santos, M. E., Chávez-Bárceñas, A. T., & Morales-Montelongo, K. L. (2017). Hongos asociados al síndrome de la roña del aguacate en el Estado de Michoacán, México. *Memorias Del V Congreso Latinoamericano Del Aguacate*, 181–189.
- Alghuthaymi, M. A., Rajkuberan, C., Rajiv, P., Kalia, A., Bhardwaj, K., Bhardwaj, P., Abd-Elsalam, K. A., Valis, M., & Kuca, K. (2021). Nanohybrid antifungals for control of plant diseases: Current status and future perspectives. *Journal of Fungi*, 7(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof7010048>
- AR(Alliance Rainforest). (2011). Lista de Plaguicidas Prohibidos. *Red de Agricultura Sostenible*, 8.
- Bellotto, M., Rebours, B., Clause, O., Lynch, J., Cedex, R. M., Bazin, D., & Elkaï, E. (1996). *1996-Bellotto\_Hydrotalcite Decomposition Mechanism.pdf*. 3654(96), 8535–8542.
- Benito, E. P., Arranz, M., & Eslava, A. P. (2000). Factores de patogenicidad de Botrytis cinerea. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(1), 43–46.
- Benito, P., Labajos, F. M., & Rives, V. (2009). Microwaves and layered double hydroxides: A smooth understanding. *Pure and Applied Chemistry*, 81(8), 1459–1471. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-07-01>
- Bernardo, M. P., Guimarães, G. G. F., Majaron, V. F., & Ribeiro, C. (2018). Controlled Release of Phosphate from Layered Double Hydroxide Structures: Dynamics in Soil and Application as Smart Fertilizer. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(4), 5152–5161. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04806>
- Botello, A. R. J. (2005). Golfo de México: Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. In *Golfo de México: Contaminación e impacto ambiental* :

*diagnóstico y tendencias* (Issue July). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3616.4962>

- Brindley, G. W. (1980). Thermal behavior of hydrotalcite and of anion-exchanged forms of hydrotalcite. *Clays and clay minerals*, 28(2), 87–91. <https://doi.org/10.1346/ccmn.1980.0280202>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. 1(Editorial Acribia S.A), 1073.
- Bugatti, V., Vertuccio, L., Zara, S., Fancello, F., Scanu, B., & Gorrasi, G. (2019). Green pesticides based on cinnamate anion incorporated in layered double hydroxides and dispersed in pectin matrix. *Carbohydrate Polymers*, 209(November 2018), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.033>
- Calle Collado, A., Gallar, D., & Candón-Mena, J. (2013). Agroecología política: La transición social hacia sistemas agroalimentarios sustentables. *Revista de Economía Crítica*, 16, 244–277.
- Chauhan, A. K., & Kang, S. C. (2014). Thymol disrupts the membrane integrity of Salmonella ser. typhimurium invitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Research in Microbiology*, 165(7), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.001>
- Claverán, V. G. (2018). Química. *La expedición científica de Malaspina en Nueva España*. <https://doi.org/10.2307/j.ctv233ptv.10>
- Costantino, U., Marmottini, F., Nocchetti, M., & Vivani, R. (1998). New synthetic routes to hydrotalcite-like compounds – characterisation and properties of the obtained materials. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1998(10), 1439–1446. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0682\(199810\)1998:10<1439::aid-ejic1439>3.3.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-0682(199810)1998:10<1439::aid-ejic1439>3.3.co;2-t)
- de Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against Candida species involved with infections in the oral cavity: An in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0947-2>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

- FAO. (2010). Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana. *Ipes/Fao*, 94. <http://www.fao.org/3/a-as435s.pdf>
- Faustini, M., Nicole, L., Ruiz-Hitzky, E., & Sanchez, C. (2018). History of organic–inorganic hybrid materials: Prehistory, art, science, and advanced applications. *advanced functional materials*, 28(27), 1–30. <https://doi.org/10.1002/adfm.201704158>
- Fernández, M. (2016). Síntesis de hidróxidos dobles laminares (HDL) y su aplicación a la eliminación de colorantes aniónicos en disoluciones acuosas. (Tesis pregrado). *Universidad Politécnica de Madrid*.
- Fetter, G., Hernández, F., Maubert, A. M., Lara, V. H., & Bosch, P. (1997). Microwave irradiation effect on hydrotalcite synthesis. *Journal of Porous Materials*, 4(1), 27–30. <https://doi.org/10.1023/A:1009619005529>
- Food & Beverages. (2021). *U.S. Food and Drug Administration*. <https://www.fda.gov/food/new-era-smarter-food-safety>
- García, Cepero De, M. C. (2012). *Biología de hongos* (E. U.-U. de los Andes (ed.)). [https://books.google.es/books?id=pS2RDwAAQBAJ&dq=hongos+y+su+clasificaci+on&lr=&hl=es&source=gb\\_s\\_navlinks\\_s](https://books.google.es/books?id=pS2RDwAAQBAJ&dq=hongos+y+su+clasificaci+on&lr=&hl=es&source=gb_s_navlinks_s)
- Godoy, R., Duarte, M., & Meza, J. (2013). Los biopreparados para la producción de hortalizas en la agricultura urbana y periurbana. In *Fao*. <http://www.fao.org/3/a-i3360s.pdf>
- Goyeneche, L. M. (2018). Facultad de determinación del tamaño de rayos X ( Determination of particle size by X-Ray diffraction ) *Autor: Lucía Martínez Goyeneche Director : Fernando Aguado Menéndez*.
- Guillén, J. M. A., García, A. T., & Giordano, K. (2010). Tecnológico de Monterrey. *The Development of University-Based Entrepreneurship Ecosystems: Global Practices*, 122–148. <https://doi.org/10.4337/9781849805896.00016>
- Harari, Y. N. (2014). *Sapiens de animales a dioses*.
- He, J., Li, B., Evans, D. G., & Duan, X. (2004). Synthesis of layered double hydroxides in an emulsion solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 251(1–3), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.09.032>
- Huerta, G., Holguín, F., Benítez, F., & Toledo, J. (2009). Epidemiología de la

Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides*] (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2), 93–105. [https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61212195002%0Ahttp://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092009000200002](https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61212195002%0Ahttp://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000200002)

James Bridle. (2020). *La nueva edad oscura* (Primera ed).

Jarvis, W. R. (1977). Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity. *Research Station*, 15(15), 1–208.

Jiménez, C. S., & Arízaga, G. G. C. (2016). Sistema de síntesis de hidróxidos dobles laminares con nitrato para reducir contaminación con carbonato y monitoreo de intercambio de nitrato interlaminar. *Avances En Química*, 11(1), 11–16.

Juárez, J. R., Castro, A. J., Jaúregui, J. F., Lizano, J. V., Carhuapoma, M., Choquesillo, F. F., Félix, L. M., Cotillo, P. A., López, J. P., Jaramillo, M. R., Córdova, A. I., Ruíz, J. R., & Ramos, N. J. (2010). Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de citrus sinensis L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica Chemical composition, antibacterial activity of essential oil Citrus sinensis L. (Sweet orange) and formulation. *Ciencia e Investigación*, 13(1), 9–13.

Kloprogge, J. T., Hickey, L., & Frost, R. L. (2004). FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of synthetic Mg/Zn/Al-hydrotalcites. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(11), 967–974. <https://doi.org/10.1002/jrs.1244>

Koike, T & Bolda, M, 2016. (2016). El moho gris, o pudrición de fresa introducción y significado. *Comisión de La Fresa California*, 13, 1–6. <http://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>

Larrea, E. D. E., Bañuelos-valenzuela, R., Delgadillo-ruiz, L., & Echavarría-cháirez, F. (2018). *Composición química y ftir de extractos etanólicos de*. 309–321.

Lemus-Soriano, B. A., & Pérez-Aguilar, D. A. (2017). Manejo de la antracnosis del aguacate con biofungicidas. *V Congreso Latinoamericano Del Aguacate*, 5. [http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias\\_VCLA/2017/Memorias\\_VCLA\\_2017\\_PG\\_135.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_135.pdf)

Lobo-Sánchez, M., Nájera-Meléndez, G., Luna, G., Segura-Pérez, V., Rivera, J. A., & Fetter, G. (2018). ZnAl layered double hydroxides impregnated with eucalyptus oil as efficient hybrid materials against multi-resistant bacteria. *Applied Clay Science*, 153(October 2017), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.11.017>

- López Camacho, R. (2007). Productos forestales no maderables: Importancia e impacto de su aprovechamiento. *Colombia Forestal*, 11(0), 215. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2008.1.a14>
- Martínez, D. R., & Carbajal, G. G. (2012). Hidróxidos dobles laminares: Arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances En Química*, 7(1), 87–99.
- Mendoza Damián, G. (2017). *Síntesis y Caracterización de Hidróxidos dobles Laminares (HDL) con adición de cationes  $M^{+4}$* . 192.
- Mexicana, R., De, I. Q., Su, D. E. M. Y., On, E., & Adsorbente, Y. (2015). Materiales mesoporosos tipo hidrotalcita obtenidos por sol-gel asistido con irradiación de microondas y su evaluación catalítica y adsorbente. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 711–722.
- Meyn, M., Beneke, K., & Lagaly, G. (1990). Anion-Exchange Reactions of Layered Double Hydroxides. *Inorganic Chemistry*, 29(26), 5201–5207. <https://doi.org/10.1021/ic00351a013>
- Miao, S., Naumann d'Alnoncourt, R., Reinecke, T., Kasatkin, I., Behrens, M., Schlögl, R., & Muhler, M. (2009). A study of the influence of composition on the microstructural properties of ZnO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mixed oxides. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 7, 910–921. <https://doi.org/10.1002/ejic.200800987>
- Mishra, G., Dash, B., & Pandey, S. (2018). Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. In *Applied Clay Science* (Vol. 153, pp. 172–186). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.12.021>
- Mishra, G., Dash, B., Pandey, S., Sethi, D., & Kumar, C. G. (2018). Comparative Evaluation of Synthetic Routes and Antibacterial/Antifungal Properties of Zn-Al Layered Double Hydroxides Containing Benzoate Anion. *Environmental Engineering Science*, 35(3), 247–260. <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0062>
- Miyata, S. (1975). *The systems  $Mg^{+2}$ ,  $Al^{+3}$  -  $NO_3^-$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Al^{+3}$  -Cl, the syntheses of hydrotalcite-like physico-chemical properties i*: 23, 369–375.
- Miyata, S. (1983). *Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds*. 31(4), 305–311.
- Montoya, G. (2010). Una alternativa de diversificación para el eje Cafetero. *Universidad Nacional de Colombia*, 1, 13. <http://bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>

- Morales-Irigoyen, E. E., de las Mercedes Gómez-y-Gómez, Y., Flores-Moreno, J. L., & Franco-Hernández, M. O. (2018). A bionanohybrid ZnAl-NADS ecological pesticide as a treatment for soft rot disease in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21430–21439. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9875-7>
- Murgueitio, E., Pinto, W., & Landivar, J. (2015). Remoción de cromo (Vi) a partir de agua sintética a nivel de laboratorio, mediante el uso de hidróxidos dobles laminares (Hdl). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 81(2), 160–170. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v81i2.26>
- Newman, S. P., & Jones, W. (1998). Synthesis, characterization and applications of layered double hydroxides containing organic guests. *New Journal of Chemistry*, 22(2), 105–115. <https://doi.org/10.1039/a708319j>
- Nguyen, T. N., Huynh, T. N. M., Hoang, D. Q., Nguyen, D. H., Nguyen, Q. H., & Tran, T. H. (2019). Functional nanostructured oligochitosan-silica/ carboxymethyl cellulose hybrid materials: Synthesis and investigation of their antifungal abilities. *Polymers*, 11(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym11040628>
- Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., García, C. M., & Durango, D. L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1), 3–13. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762011000100001>
- Oh, J. M., Biswick, T. T., & Choy, J. H. (2009). Layered nanomaterials for green materials. *Journal of Materials Chemistry*, 19(17), 2553–2563. <https://doi.org/10.1039/b819094a>
- Oviedo Berrocal, L. A. (2014). *Biotransformación de los sustratos Timol y Carvacrol mediante el hongo fitopatogeno Colletotrichum acutatum*. 111. <http://www.bdigital.unal.edu.co/11772/>
- Patil, K. C., Aruna, S. T., & Mimani, T. (2002). Combustion synthesis: An update. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(6), 507–512. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00123-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00123-7)
- Rajeshwar, K., & De Tacconi, N. R. (2009). Solution combustion synthesis of oxide semiconductors for solar energy conversion and environmental remediation. *Chemical Society Reviews*, 38(7), 1984–1998. <https://doi.org/10.1039/b811238j>
- Ram Reddy, M. K., Xu, Z. P., Lu, G. Q., & Da Costa, J. C. D. (2006). Layered double

hydroxides for CO<sub>2</sub> capture: Structure evolution and regeneration. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(22), 7504–7509. <https://doi.org/10.1021/ie060757k>

- Ramírez Llamas, L. A., Jacobo Azuara, A., & Martínez Rosales, J. M. (2015). Adsorción del naranja de metilo en solución acuosa sobre hidróxidos dobles laminares. *Acta Universitaria*, 25(3), 25–34. <https://doi.org/10.15174/au.2015.778>
- Ramos, E., Lopez, T., Bosch, P., Asomoza, M., & Gomez, R. (1997). Thermal Stability of Sol-Gel Hydrotalcites. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8(1–3), 437–442. <https://doi.org/10.1007/BF02436879>
- Reina, F. D., Roche, L. A., Bianchi, M. A., Languasco, J. M., & Della Rocca, P. (2016). Análisis químico de las especias: tomillo y salvia. *Proyecciones*, 14, n(1), 89–96.
- Rocha Oliveira, G., Dias Do Amaral, L. J., Giovanela, M., Da Silva Crespo, J., Fetter, G., Rivera, J. A., Sampieri, A., & Bosch, P. (2015). Bactericidal performance of chlorophyllin-copper hydrotalcite compounds. *Water, air, and soil pollution*, 226(9), 226–316. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2585-1>
- Ruiz-Hitzky, E., Aranda, P., Darder, M., & Rytwo, G. (2010). Hybrid materials based on clays for environmental and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 20(42), 9306–9321. <https://doi.org/10.1039/c0jm00432d>
- Sabourin, E., & Patrouilleau, M. M. (2017). Políticas públicas y desarrollo de la agroecología en América Latina y el Caribe. In *FAO*.
- Santana-Cruz, A., Flores-Moreno, J. L., Guerra-González, R., & Martínez-Ortiz, M. D. J. (2016). Antibacterial activity of pipemidic acid ions-MgFeAl layered double hydroxide hybrid against *E. Coli* and *S. typhi*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60(2), 62–66. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v60i2.74>
- Santana, A. (2014). *Materiales híbridos como bactericidas de Escherichia coli*. 0–158.
- Shapiro, S., & Guggenheim, B. (1995). The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(4), 241–246. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1995.tb00149.x>
- Shen, J., Kobe, J. M., Chen, Y., & Dumesic, J. A. (1994). Synthesis and Surface Acid/Base Properties of Magnesium-Aluminum Mixed Oxides Obtained from Hydrotalcites. *Langmuir*, 10(10), 3902–3908. <https://doi.org/10.1021/la00022a082>

- Sidhu, A., Bala, A., Singh, H., Ahuja, R., & Kumar, A. (2020). Development of MgO-sepiolite Nanocomposites against Phytopathogenic Fungi of Rice (*Oryza sativa*): A Green Approach. *ACS Omega*, 5(23), 13557–13565. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00008>
- Sociedad, R. De, Desarrollo, C., & Hortalizas, D. E. F. Y. (2011). Natural Antimicrobial Agent Use in the Preservation of Fruits and Vegetables. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170.
- Sofía, B., Cecilia, D., & Roberto, R. (2015). Evaluación de timol para el control antifúngico sobre películas de pintura. *Revista Materia*, 20(3), 699–704. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620150003.0073>
- Torreiro, Y. (2018). *Desarrollo y mejora de materiales adsorbentes para capturar CO<sub>2</sub> con producción de H<sub>2</sub> en procesos de gasificación.*
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. D. J., Ulloa, O. A., Ramírez-Ramírez, O. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., & Bautista Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 3953. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>
- Wan, D., Liu, Y., Xiao, S., Chen, J., & Zhang, J. (2015). Uptake fluoride from water by caclined Mg-Al-CO<sub>3</sub> hydrotalcite: Mg/Al ratio effect on its structure, electrical affinity and adsorptive property. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 469, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.045>
- Weisany, W., Samadi, S., Amini, J., Hossaini, S., Yousefi, S., & Maggi, F. (2019). Enhancement of the antifungal activity of thyme and dill essential oils against *Colletotrichum nymphaeae* by nano-encapsulation with copper NPs. *Industrial Crops and Products*, 132(January), 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.031>
- Wezel, A., Bellon, S., Doré, T., Francis, C., Vallod, D., & David, C. (2009). Agroecology as a science, a movement and a practice. *Sustainable Agriculture*, 2, 503–515. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_3)
- Wu, Y., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>
- XueDuan, J. H. ·Min W. · B. L. ·Yu K. D. G. E. ·. (2013). Layered double hydroxides

(LDH). In *Developments in Clay Science* (Vol. 5, Issue September 2005, pp. 745–782). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-098258-8.00025-0>

Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R., & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science and Technology*, 53(7), 3347–3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>

## 10 Anexos

### 10.1 Lugar de elaboración

La parte experimental se llevó a cabo en dos sedes:

1. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco.

División de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Departamento de Ciencias Básicas.

Área de Química de Materiales.

Edificio W, 1. ° piso.

2. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

División de Ciencias en Ingeniería Ambiental.

Posgrado de Ingeniería Química.

Área de Química de Materiales y Microbiología.

Edificio IQ

Instituto de investigaciones químico biológicas

Laboratorio de biotecnología de plantas

Edificio (U-3)