

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Estudio de la actividad biológica *in vitro* de nanopartículas de plata y óxido de zinc frente microorganismos patógenos y benéficos (*Fusarium Oxysporum* f.sp. cubense raza 1, *Pseudocercospora fijiensis* y *Trichoderma spp*) de las plantaciones de banano.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Freddy Roger Carlos García

Evelin Odalis Escobar Hidalgo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mis padres, quienes me han brindado siempre todo su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Gracias a su paciencia y sus consejos he podido lograr cada objetivo que me he propuesto.

A mis hermanos quienes supieron guiarme y ayudarme cuando lo necesitaba. A mis abuelos por transmitirme siempre alegría y la fortaleza para afrontar cualquier situación.

Finalmente, a toda mi familia, amigos y aquellos docentes quienes con su amabilidad y enseñanzas me motivaron a no rendirme con facilidad.

Freddy Roger Carlos García

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico especialmente a Dios, por iluminar mi sendero en todo momento y brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A mis queridos padres, por ser mi soporte incondicional en cada instante y por su constante esfuerzo para que pueda cumplir esta meta. A mi padre, por sus consejos y consentirme siempre. A mi madre por su apoyo e inmenso amor. ¡Son lo más preciado que tengo!

A toda mi familia, a mis mejores amigas, por siempre animarme y a mis cachorros que me llenan de felicidad.

Evelin Odalis Escobar Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento a los Doctores Joel Vielma y Pablo Chong, por brindarnos la oportunidad de continuar con el proyecto y guiarnos en este periodo.

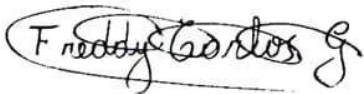
A todo el equipo del CIBE, especialmente a los analistas Ricardo Pacheco, Jeffry Vargas por su constante apoyo y colaboración.

Finalmente, a nuestros amigos que conocimos a lo largo de estos años, en particular a Alejandra y Alejandro, por mostrarnos su ayuda y confianza en todo momento.

Freddy Carlos y Evelin Escobar

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Freddy Roger Carlos García y Evelin Odalis Escobar Hidalgo* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



**Freddy Roger
Carlos García**



**Evelin Odalis
Escobar Hidalgo**

EVALUADORES

Nadia Flores, M. Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:
**JOEL EDUARDO
VIELMA PUENTE**

Joel Vielma Puente, Ph.D.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El incremento de enfermedades fúngicas y las consecuencias de usar pesticidas convencionales ha generado una gran pérdida en los cultivos bananeros. Por ello, se propone sintetizar nanopartículas de plata y óxido de zinc ecológicas para analizar su comportamiento frente a microorganismos patógenos y benéficos, ya que estas han demostrado tener propiedades antifúngicas. Sin embargo, se espera que no afecten totalmente al microorganismo usado como biocontrol. La implementación del proyecto permite conservar la integridad del medio ambiente y producto.

El proyecto se desarrolló en dos etapas; Inicialmente, se sintetizó las nanopartículas por el método verde. Este consiste en usar como agente reductor el extracto de las hojas del árbol *Psidium guayaquilensis* y reactivos que impulsan la reacción. Su caracterización se logró con la técnica de espectroscopía uv-Visible y SEM. Posteriormente, Se incubó los microorganismos patógenos (*Fusarium*, *Pseudocercospora*) y benéfico (*Trichoderma*) en placas de micropocillo con diferentes concentraciones de nanopartículas.

Se obtuvo nanopartículas de plata con 81% de rendimiento y de óxido de zinc con 87%. Mediante la longitud de onda uv-Vis, se determinó que el tamaño de Ag-NPs es 23 nm y ZnO-NPs 7nm. Ambas demostraron tener actividad antifúngica con hongos patógenos a concentraciones menores a 30 y 1000 ppm respectivamente, mientras que el benéfico necesita de mayor concentración, 45 y 1200ppm respectivamente, para inhibir totalmente su crecimiento. Es decir, que al utilizar una disolución de nanopartículas con una concentración de aproximadamente 30 ppm se inhibirá la acción de los patógenos, pero preservar la presencia del hongo biocontrol.

Palabras Clave: Nanopartículas, Plata, Óxido de zinc, Microorganismos, Inhibición.

ABSTRACT

The increase in fungal diseases and the consequences of using conventional pesticides have generated a great loss in banana crops. For this reason, it is proposed to synthesize ecological silver and zinc oxide nanoparticles to analyze their behavior against pathogenic and beneficial microorganisms, since these have been shown to have antifungal properties. However, it is expected that they will not fully affect the microorganism used as a biocontrol. The implementation of the project allows preserving the integrity of the environment and product.

*The project was developed in two stages; Initially, the nanoparticles were synthesized by the green method. This consists of using the extract of the leaves of the *Psidium guayaquilensis* tree as a reducing agent and reagents that promote the reaction. Its characterization was achieved with the technique of uv-Visible spectrometry and SEM. Subsequently, the pathogenic (*Fusarium*, *Pseudocercospora*) and beneficial (*Trichoderma*) microorganisms were incubated in microwell plates with different concentrations of nanoparticles.*

Silver nanoparticles with 81% yield and zinc oxide with 87% yield were obtained. Using the uv-Vis wavelength, it was determined that the size of Ag-NPs is 23 nm and ZnO-NPs 7nm. Both demonstrated to have antifungal activity with pathogenic fungi at concentrations lower than 30 and 1000 ppm respectively, while the beneficial one needs a higher concentration, 45 and 1200 ppm respectively, to totally inhibit its growth. In other words, using a solution of nanoparticles with a concentration of approximately 30 ppm will inhibit the action of pathogens, but preserve the presence of the biocontrol fungus.

Keywords: *Nanoparticles, Silver, Zinc oxide, Microorganisms, Inhibition.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	6
RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Marco teórico.....	5
1.4.1 Síntesis de nanopartículas.....	5
1.4.2 Síntesis verde.....	5
1.4.3 Caracterización de nanopartículas	6
1.4.4 Cultivo de microorganismo.....	6
1.4.5 Microorganismos benéficos	6
1.4.5.1 <i>Trichoderma spp</i>	7
1.4.6 Microorganismos patógenos.....	7

1.4.6.1	<i>Fusarium oxysporum (Foc)</i>	8
1.4.6.2	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	8
1.4.7	Metodología de análisis de inhibición	8
1.4.7.1	Concentración mínima inhibitoria CMI	8
1.4.7.2	Reactivo Alamar Blue	9
CAPÍTULO 2.....		10
2	METODOLOGÍA	10
2.1	Producción de nanopartículas de plata y óxido de zinc (Ag-NPs y ZnO-NPs)	11
2.1.1	Elaboración del extracto <i>Psidium guayaquilensis</i>	11
2.1.2	Elaboración de la disolución de nitrato de plata (AgNO ₃)	12
2.1.3	Elaboración de la disolución de nitrato de zinc Zn(NO ₃) ₂	12
2.1.4	Síntesis de nanopartículas de plata (Ag-NPs).....	12
2.1.5	Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs).....	13
2.2	Caracterización de las Ag-NPs y ZnO-NPs	13
2.3	Disolución de las nanopartículas con solvente Polyvinylpyrrolidone	14
2.4	Evaluación inhibitoria de las nanopartículas frente a los microorganismos.....	14
2.4.1	Cultivo de microorganismos.....	14
2.4.2	Suspensión y determinación de la concentración de los microorganismos	15
2.4.3	Incubación del microorganismo con el fungicida.....	16
2.4.3.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	17
CAPÍTULO 3.....		18
3	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	18
3.1	<i>Elaboración de nanopartículas</i>	18
3.1.1	Síntesis de nanopartículas de plata	18
3.1.2	Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc	19
3.2	<i>Caracterización de nanopartículas</i>	19

3.2.1	Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis)	19
3.2.1.1	Nanopartículas de plata (Ag-NPs)	19
3.2.1.2	Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs)	20
3.2.2	Microscopio electrónico de barrido SEM	21
3.2.2.1	Nanopartículas de plata (Ag-NPs)	21
3.2.2.2	Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs)	22
3.3	Análisis del inóculo con las nanopartículas (Ag-NPs y ZnO-NPs)	23
3.3.1	Cultivo de aislados	23
3.3.2	Establecer la concentración de cada especie	24
3.3.3	Determinar la concentración mínima inhibitoria de las Ag-NPs y ZnO-NPs	25
3.4	Análisis de costo	31
CAPÍTULO 4		33
4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
4.1	Conclusiones	33
4.2	Recomendaciones	34
5	REFERENCIAS	36
6	ANEXOS	39
6.1	Resultados del microorganismo patógeno (Fusarium) con las Ag-NPs	39
6.2	Resultados del microorganismo patógeno (Pseudocercospora) con las Ag-NPs	41
6.3	Resultados del microorganismo patógeno (Trichoderma spp) con las Ag-NPs	44
6.4	Resultados de los microorganismos con las nanopartículas de óxido de zinc	46

SIMBOLOGÍA

μL	Microlitro
L	Litro
h	Horas
min	Minutos
g	Gramos
mg	Miligramos
°C	Grados centígrados
nm	Nanómetros
ppm	Parte por millón
rpm	Revoluciones por minuto
pH	Potencial de Hidrógeno
Ag	Plata
Zn	Zinc
NPs	Nanopartículas
Ag-NPs	Nanopartículas de Plata
ZnO-NPs	Nanopartículas de Óxido de Zinc
PDB	Potato Dextrose Broth
PDA	Potato Dextrose Agar
MHB	Mueller Hilton Broth
LB	Luria Bertani

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Diseño conceptual de la metodología, donde se detalla de manera general la secuencia de los pasos necesarios para el desarrollo del proyecto.....	11
Figura 3.1. Coloración de la disolución de nanopartículas de plata luego del periodo de reacción.....	18
Figura 3.2. Coloración de la disolución de nanopartículas de óxido de zinc luego del periodo de reacción y después del ajuste de pH.....	19
Figura 3.1. Espectro UV-Visible (UV-Vis) de la disolución del extrado y del reactivo.....	20
Figura 3.4. Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata.....	20
Figura 3.5. Espectro UV-Visible (UV-Vis) de la disolución del extrado y del reactivo.....	21
Figura 3.6. Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de óxido de zinc.....	21
Figura 3.7. Micrografía SEM de nanopartículas de plata sintetizadas verdes.....	22
Figura 3.8. Micrografía SEM de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas verdes.....	22
Figura 3.9. Crecimiento de los aislados de <i>Fusarium</i>	23
Figura 3.10. Crecimiento de los aislados de <i>Trichoderma</i>	23
Figura 3.11. Crecimiento de los aislados de <i>Pseudocercospora</i>	24
Figura 3.12. Visualización del microscopio con el objetivo 10X y 40X.....	24
Figura 3.13. Propiedad inhibidora de las Ag-NPs frente al hongo <i>Fusarium</i> (EC. 15,40,35).....	25
Figura 3.14. Propiedad inhibidora de las Ag-NPs frente al hongo <i>Pseudocercospora</i>	26
Figura 3.15. Propiedad inhibidora de las Ag-NPs frente al hongo <i>Trichoderma</i>	28

Figura 3.16. Propiedad inhibidora de las ZnO-NPs frente a los microorganismos.....	29
Figura 6.1. Representación gráfica del desarrollo FOC.EC15 expuestos a las Ag-NPs. ...	40
Figura 6.2. Representación gráfica del desarrollo FOC.EC40 expuestos a las Ag-NPs.....	40
Figura 6.3, Representación gráfica del desarrollo FOC.EC.35 expuestos a las Ag-NPs.....	40
Figura 6.4. Representación gráfica del desarrollo FOC.EC16 expuestos a las Ag-NPs.....	40
Figura 6.5. Representación gráfica del desarrollo FOC.EC15 expuestos a las Ag-NPs.....	41
Figura 6.6. Representación gráfica del desarrollo de IS.46 expuestos a las Ag-NPs.....	42
Figura 6.7. Representación gráfica del desarrollo de IS.45 expuestos a las Ag-NPs.....	43
Figura 6.8. Representación gráfica del desarrollo de IS.7 expuestos a las Ag-NPs.....	43
Figura 6.9. Representación gráfica del desarrollo de IS.4 expuestos a las Ag-NPs.....	43
Figura 6.10. Representación gráfica del desarrollo de IS.15 expuestos a las Ag-NPs.....	43
Figura 6.11. Representación gráfica del desarrollo BAM.15 expuestos a las Ag-NPs.....	45
Figura 6.12. Representación gráfica del desarrollo BAM.3 expuestos a las Ag-NPs.....	45
Figura 6.13, Representación gráfica del desarrollo BAM.35 expuestos a las Ag-NPs	45
Figura 6.14. Representación gráfica del desarrollo BAM.21 expuestos a las Ag-NPs	46
Figura 6.15. Representación gráfica del desarrollo BAM.7 expuestos a las Ag-NPs.....	46
Figura 6.16. Representación gráfica del desarrollo EC.35 expuestosa las ZnO-NPs.....	47
Figura 6.17. Representación gráfica del desarrollo BAM.3 expuestos a las ZnO-NPs.....	47
Figura 6.18. Representación gráfica del desarrollo IS.7 expuestos a las ZnO-NPs	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Parámetros empleados en el espectrofotómetro para la caracterización de las nanopartículas de plata y óxido de zinc.....	14
Tabla 2.2 Resumen de las condiciones de crecimiento de cada microorganismo.....	15
Tabla 2.3 Diseño de la placa de micropocillos para hacer el análisis de inhibición.....	16
Figura 3.2 Coloración de la disolución de nanopartículas de óxido de zinc luego del periodo de reacción y después del ajuste de pH.....	19
Tabla 3.1 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.....	25
Tabla 3.2 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.	26
Tabla 3.3 Tabla de resultado total del microorganismo <i>Fusarium oxysporum</i>	26
Tabla 3.4 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.	27
Tabla 3.5 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.	27
Tabla 3.6 Tabla de resultado total del microorganismo <i>Pseudocercospora</i>	27
Tabla 3.7 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.	28
Tabla 3.8 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.	28
Tabla 3.9 Tabla de resultado total del microorganismo benéfico	28
Tabla 3.10 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo	29
Tabla 3.11 Tabla de resultado total de los microorganismos con ZnO-NPs.	29
Tabla 3.12 Costos de implementación del presente estudio	32
Tabla 6.1 Porcentaje de supervivencia de los cinco aislados de <i>Fusarium</i> por triplicado	39
Tabla 6.2 Tabla de promedio, desviación estándar y porcentaje de inhibición de cada aislado ...	39
Tabla 6.3 Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio, desviación estándar individual y global	41

Tabla 6.4	Porcentaje de supervivencia de aislados de <i>Pseudocercospora</i> por triplicado.....	41
Tabla 6.5	Tabla de promedio, desviación estándar y porcentaje de inhibición de los aislado.....	42
Tabla 6.6	Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio,desviación estándar individual y global	44
Tabla 6.7	Porcentaje de supervivencia de los cinco aislados de <i>Trichoderma</i> por triplicado	44
Tabla 6.8	Tabla de promedio, desviación estándar y porcentaje de inhibición de cada aislado..	44
Tabla 6.9	Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio,desviación estándar individual y global.....	46
Tabla 6.10	Porcentaje de supervivencia de los microorganismos por triplicado.....	46
Tabla 6.11	Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio,desviación estándar individual y global.....	47

CAPITULO 1

1 INTRODUCCIÓN

Ecuador se ha caracterizado, por ser un país agrícola fundamentalmente de productos como cacao, banano, flores y otros más. En la actualidad, únicamente el sector bananero aporta 26% del producto interno bruto agrícola, por lo cual es uno de los más importantes (Anahí Macaroff y Stalin Herrera, 2022). No obstante, en los últimos meses se han registrados pérdidas por enfermedades fúngicas en estas plantaciones. Ante este problema, los agricultores hacen uso de fungicidas, pero los efectos obtenidos no siempre son los deseados.

Una alternativa propuesta al uso de pesticidas es la aplicación de nanopartículas verdes. Estas reducen en gran medida la contaminación y disponen de la capacidad de inhibir microorganismos. Sin embargo, no se conoce por completo el efecto que poseen sobre ciertos microorganismos benéficos para las plantas. Por lo cual, se hace evidente la necesidad de identificar si las nanopartículas de plata y óxido de zinc poseen la facultad de discriminar las propiedades nutritivas/benéficas frente a las infecciosas de los microorganismos presentes en las plantas de banano.

1.1 Descripción del problema

Actualmente, se prevé que el ataque de enfermedades fúngicas representa el 25% de las pérdidas de cultivo bananero (Malandrakis et al., 2019). Ecuador sobresalía por exportar más de 317 millones de cajas de banano por año. Pero ahora enfrenta una complicada época, según la Agencia de Regulación y Control Fitopatológica, Agrocalidad en Ecuador, en el 2021 se reportaron 84 brotes y en el 2022 se han reportado 35 brotes de enfermedades. Además, se registra un aumento de costo en los insumos; fertilizantes, plástico y cartón. Por lo tanto, el precio promedio internacional de una caja de banano ecuatoriano ha incrementado un 22%, según Oikonomics (Anahí Macaroff y Stalin Herrera, 2022).

Por el momento, la única solución para combatir las enfermedades son los fungicidas sintéticos convencionales, por ejemplo; Cumora, Dithane 60, Bravo 720, entre otros, puesto que son más efectivos y rentables. Sin embargo, el uso intenso y el modo de aplicación arrastran problemas ambientales, debido a la alta concentración de residuos, ya que se ha registrado que el 90% de la agricultura los utiliza. Además, con el paso de los años los hongos fitopatógenos han generado resistencia contra los pesticidas. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas es de suma importancia, como la nanotecnología que mejora la actividad antimicrobiana de los materiales al convertirlos en nanopartículas (NP) (Malandrakis et al., 2019).

Se ha demostrado mediante varias investigaciones que las NP que contienen plata (Ag-NP) tienen una amplia gama de actividad inhibitoria contra bacterias, hongos y virus, dado que es altamente tóxico (Mahdizadeh et al., n.d.). Una experimentación realizada en India demostró que el crecimiento de los patógenos se redujo al máximo en un 80-90% en los dos primeros días. Luego en un 60-70% el resto de los días (Haroon et al., 2019). Por otro lado, también se ha evidenciado que las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) tienen cierto porcentaje de toxicidad contra microbios (Fakhari et al., 2019). Pero no se ha verificado que ambas sean capaces de distinguir entre organismos patógenos y benéficos, pues es importante mencionar que ciertos microorganismos trabajan como reguladores clave de la biogeoquímica.

Al momento, no hay estudios que muestren que las Ag-NPs y ZnO-NPs son capaces de eliminar los organismos benéficos de las plantas de banano, tal como lo hacen con los patógenos. Esto implica un problema al momento de incorporar las nanopartículas en las plantaciones, ya que realmente se desconoce los efectos que puedan tener sobre este tipo de microorganismos. Por tanto, el objetivo de este proyecto se centra en evaluar la capacidad inhibitoria de las Ag-NPs y ZnO-NPs sobre los tres microorganismos (dos patógenos y uno benéfico), esperando que los hongos benéficos no sean afectados por las nanopartículas de Ag y ZnO.

1.2 Justificación del problema

Los principales desafíos que enfrenta la industria bananera son consecuencias de la existencia de numerosos fitopatógenos en los cultivos. Como solución a esta problemática, se ha planteado utilizar nanopartículas en la agricultura. Las Ag-NPs y ZnO-NPs sintetizadas mediante extracto de hojas ecológicas tienen suficiente potencial biocida para la mayoría de los microorganismos (Karina Espinosas, 2021). Sin embargo, no se ha demostrado que sean selectivas entre microorganismos patógenos o benéficos, convirtiendo esta la razón de ser del presente proyecto. El cual busca determinar mediante experimentación *in vitro* si realmente los hongos benéficos no se ven afectadas o la afectación es mínima en comparación a los patógenos al estar en contacto con las Ag-NPs y ZnO-NPs.

Existen hongos promotores del crecimiento vegetal o encargadas de controlar la flora microbiana, denominados benéficos. Por ejemplo, recientes trabajos de investigación han demostrado que el hongo *Trichoderma spp* suprime significativamente el desarrollo de microorganismos patógenos, estimula el crecimiento de las plantas y mejora la absorción de nutrientes por la arquitectura de la raíz. (Zin y Badaluddin, 2020), además secreta compuestos nutritivos directamente en el medio de crecimiento (Baruzzi et al., 2017).

Este descubrimiento beneficiaría en gran magnitud a las plantaciones bananeras y específicamente al empresario/dueño de los cultivos, ya que el porcentaje de pérdidas por plagas disminuiría considerablemente, dando como resultado mayor producción. Los trabajadores y consumidores también serían beneficiados. Por un lado, al tener mayor manufactura se genera más plazas de trabajo y, por otro lado, se obtendría un producto de calidad, puesto que, al implementar esta tecnología evita el uso desmandado de pesticidas convencionales que cada día causan más perjuicios.

Además, se implementaría un fungicida ecológico que preserva el medio ambiente, favoreciendo el desarrollo del fruto y salvaguardando la integridad del consumidor. Asimismo, se pretende usar disoluciones con concentraciones menores de Ag-NPs y ZnO-NPs con el fin de causar menor peligro. Se considera un proyecto conveniente por la manera en que está limitado, pues tanto, el cultivo de los microorganismos y la incorporación del inhibidor es en medio controlado (*in vitro*). Es decir, por el momento no se contempla las condiciones variables del exterior, por tanto, es más factible controlar, medir y evaluar los resultados.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibidor de las nanopartículas de plata y óxido de zinc sobre los microorganismos benéficos y patógenos presentes en las plantaciones de banano mediante su análisis *in vitro*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de plata y óxido de zinc empleando la metodología de síntesis verde con el extracto de las hojas del árbol *Psidium guayaquilensis*.
- Examinar la integridad de los microorganismos benéficos y patógenos luego de la aplicación de las nanopartículas de plata y óxido de zinc en los cultivos controlados.
- Comparar los análisis de inhibición de las nanopartículas de plata y óxido de zinc para la determinación de su efectividad.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas se definen como cualquier partícula con una dimensión mayor a 1 nanómetro (nm) y menor a 100 nanómetros, que funciona como un todo en términos de transporte, funcionalidad de propiedades estructurales e interacciones con otras especies y su entorno. Existen diferentes métodos para producir nanopartículas; los métodos físicos utilizan técnicas como la ablación con láser; la síntesis química consiste en el crecimiento de las nanopartículas en un medio líquido compuesto por varios reactantes, un ejemplo es la reducción de una sal metálica con el borohidruro de sodio (NaBH_4), en presencia de estabilizadores. Estos reactivos además de ser costosos presentan riesgos debido a la generación de residuos tóxicos; otro método a considerar es la síntesis verde (Karina Espinosa, 2021).

1.4.2 Síntesis verde

Aunque el método convencional ha demostrado ser efectivo, se han propuesto otros métodos para realizar la síntesis de nanopartículas; uno de ellos es la síntesis verde. Esta tiene como finalidad reducir los gastos y el impacto ambiental que conlleva la aplicación del método convencional. Consiste en la utilización de extractos de plantas los cuales funcionan como agente reductor en el proceso de reducción de Ag^+ a Ag^0 , ayudando adicionalmente a estabilizar los iones Ag durante el proceso de biosíntesis para la formación de las nanopartículas. Asimismo, con las nanopartículas de óxido de zinc de Zn^{+2} a Zn^0 . El proceso es relativamente barato y amistoso ambientalmente, ya que es posible encontrar con facilidad el extracto en la naturaleza en contraste al método convencional (Waiezi et al., 2022)

1.4.3 Caracterización de nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas es una parte fundamental para verificar que la síntesis se realizó adecuadamente, además al conocer sus propiedades magnéticas permite establecer el uso más adecuado para estas. Las principales técnicas de caracterización son; TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión), HRTEM (Microscopía Electrónica de Alta Resolución), XRD (Difracción de Rayos X), AFM (Microscopía de Fuerza Atómica) y SEM (Microscopía Electrónica de Barrido). Estas técnicas permiten conocer el tamaño de las NPs, la dispersión o estructura de los átomos que se aglomeran formando dichas NPs (Karely-Chamé Fernández, 2013).

1.4.4 Cultivo de microorganismo

Los microorganismos se pueden encontrar prácticamente en cualquier lugar. Sin embargo, no siempre es posible estudiarlos en el ambiente. El cultivo de microorganismos a partir de un medio es el que hace capaz su estudio. Se trata de una herramienta de investigación bien consolidada en biología molecular para el cultivo de bacterias y hongos. Un medio de cultivo es una sustancia líquida (caldo) o sólida (agar) que contiene un conjunto de elementos que proporcionan los nutrientes y condiciones necesarias a los microorganismos para que se multipliquen. Estos elementos o sustancias pueden ser de origen orgánico o inorgánico, natural o artificial. Su finalidad es garantizar el crecimiento del organismo o célula, su identificación o diferenciación dentro de un conjunto de ellos e, incluso, inhibir el desarrollo de otros (Ciencias et al., 2018).

1.4.5 Microorganismos benéficos

Los microorganismos son muy variados y muchos de ellos actúan de tal manera que generan efectos beneficios en diferentes industrias como la alimenticia, agrícola, farmacéutica y otras más. Por ejemplo, en la industria agrícola se consideran microorganismos benéficos a aquellas bacterias u hongos que son capaces influenciar positivamente el estado nutricional de las plantas, promover el crecimiento y estimular el sistema defensivo de las plantas generando resistencia ante los patógenos (Mario Cano, 2011).

1.4.5.1 *Trichoderma spp*

Es un hongo anaerobio que puede encontrarse de manera natural en los bosques o en suelos agrícolas. Su característica morfológica común es un pigmento conidial de color verde brillante, además tienen un crecimiento rápido y se ramifican repetidamente. Generalmente es empleado como agente de control biológico en la agricultura, ya que posee la característica de atacar a otros hongos patógenos. Aparte de esto, produce una gran cantidad de enzimas inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Posee una alta tolerancia a condiciones ambientales extremas y puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura y es amigable con la naturaleza (Gómez y Garcés, 2015). Su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento. Aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 22 y 30°C), su diversidad metabólica está asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos, debido a los mecanismos de resistencia sistémica inducida (Tejera-Hernández, 2015).

1.4.6 *Microorganismos patógenos*

Los microorganismos patógenos son considerados, por ser capaces de generar enfermedades que pueden llegar a ser severas en un organismo, sea animal, planta o humano. Por ejemplo, en la industria agrícola, a diferencia de los benéficos, pueden inducir directamente enfermedades en las plantas, estimular otros patógenos presentes en el suelo o aire e inmovilizar nutrientes. Además, pueden producir toxinas y sustancias pútridas que afectan adversamente el crecimiento y salud de las plantas. Entre los microorganismos más conocidos de este tipo se encuentran las *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Fusarium*, *Pseudocercospora*, entre otros. (Teruo Higa et al., 2019).

1.4.6.1 *Fusarium oxysporum f.sp. cubense (Foc)*

Es un hongo que causa la marchitez vascular en las plantas, ingresando a las mismas desde las raíces hasta expandirse por el tejido vascular. De esta manera, no es posible la difusión del agua y los nutrientes por la planta ocasionando epinastia, marchitamiento y posteriormente la muerte de la planta. Para el cultivo de este hongo, se considera que las condiciones óptimas de incubación son 25°C de temperatura durante 5 días en un medio de PDA (Potato Dextrose Agar) (Angel Hernández, 2019).

1.4.6.2 *Pseudocercospora fijiensis*

Uno de los estreses bióticos más destructivos del banano es la Sigatoka negra, una enfermedad fúngica de la hoja causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*. La enfermedad es policíclica y da como resultado múltiples infecciones en un ciclo de banano, lo que provoca daños sustanciales en las hojas y pérdidas de rendimiento de > 50 sin el uso de fungicidas. Las condiciones favorables para la infección y proliferación de *P. fijiensis* es a una temperatura máxima de 30°C, mínima de 18°C y una humedad relativa del 76,3% (Kimunye et al., 2021).

1.4.7 Metodología de análisis de inhibición

1.4.7.1 Concentración mínima inhibitoria CMI

Se basa en determinar de forma precisa la concentración más baja (ppm o µg/mL) a la que un fungicida es capaz de inhibir el crecimiento visible de una determinada cepa bacteriana después del periodo de incubación. En otras palabras, se trata de medir la susceptibilidad de los organismos ante los antimicrobianos y se utiliza para determinar la eficacia de un antibiótico contra una cepa bacteriana particular. La CMI, generalmente se determina mediante un método de dilución en caldo, donde se realizan diluciones en serie del fármaco en un medio líquido que contiene un inóculo estandarizado del organismo (Taiyari et al., 2021). Con respecto a la concentración letal media LC50, se trata de una medida que evalúa el efecto tóxico de una sustancia medida a la cual el 50% de los organismos mueren en un periodo de exposición determinado (Productividad & Agroproductividad, n.d.)

1.4.7.2 Reactivo Alamar Blue

La experimentación requiere del reactivo Alamar Blue (AB) para cuantificar la viabilidad celular in vitro de los microorganismos o estudiar la sensibilidad del inhibidor. Es un colorante azul no fluorescente soluble en agua extremadamente estable, no es tóxico (Al-Nasiry et al., 2007). Su principio activo es la resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona), el cual monitorea el ambiente reductor de la célula viva. El tinte actúa cualitativamente como un cambio visible en el color que indica la presencia o ausencia de células viables (Byth et al., 2001).

La forma oxidada del AB ingresa al citosol y se convierte a la forma reducida por la actividad enzimática mitocondrial al aceptar electrones de NADPH, FADH, FMNH, NADH, y citocromos. Esta reacción redox va acompañada de un cambio de color del medio de cultivo de azul índigo a rosa fluorescente en respuesta a la alta actividad metabólica, que se puede medir fácilmente mediante lectura fluorométrica. Las señales de fluorescencia se miden en una longitud de onda de excitación de 530 a 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm (Rampersad, 2012).

El porcentaje de reducción de oxigenación del microorganismo se calcula de la siguiente forma:

Ecuación 1. Ecuación para determinar el porcentaje de oxigenación de los microorganismos

$$\% \text{Reducción del reactivo AlamarBlue} = \frac{\text{Valor RFU experimental} - \text{Valor RFU control negativo}}{100\% \text{ de reducción de RFU de control positivo} - \text{Valor RFU control negativo}}$$

Donde RFU es la unidad relativa de fluorescencia

CAPÍTULO 2

2 METODOLOGÍA

En este capítulo se pretende detallar el método a utilizar para la elaboración del presente proyecto. Se va a seguir las bases del diseño comparativo y exploratorio, ya que se intenta cotejar el porcentaje de inhibición de las nanopartículas de plata y óxido de zinc frente los microorganismos patógenos y benéficos. Además, determinar las variables que tienen mayor y media influencia en la inhibición. Las variables de interés a considerar en la experimentación son las siguientes; tipo de microorganismo y concentración de las nanopartículas de plata y óxido de zinc. Con respecto a las variables no controladas se considera las condiciones climáticas de las regiones donde fueron extraídos los aislados.

Inicialmente, se consideraron dos diferentes alternativas para estudiar la inhibición de las Ag-NPs y ZnO-NPs. Estas son ARN de interferencia (ARNi) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) junto con la concentración letal media LC50. Sin embargo, al final se decidió solo utilizar la segunda opción, ya que, la primera demanda mayor tiempo y gasto, pero la principal ventaja de la metodología escogida es que trata de simular las condiciones del exterior, porque requiere de medio líquido para la interacción.

Para llevar a cabo el proyecto se siguió el siguiente protocolo:



Figura 2.1 Diseño conceptual de la metodología necesaria para el desarrollo del proyecto

2.1 Producción de nanopartículas de plata y óxido de zinc (Ag-NPs y ZnO-NPs)

La primera parte de la experimentación del proyecto se enfoca en la síntesis de las nanopartículas y su caracterización. Lo cual se llevó a cabo en los Laboratorios c-Sinqui y Química Instrumental de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas (FCNM) en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

2.1.1 Elaboración del extracto *Psidium guayaquilensis*

La experimentación comenzó pesando 10 g de las hojas del árbol *Psidium guayaquilensis*, previamente trituradas, en un vidrio de reloj usando una balanza analítica RADWAG-AS 220 R2. Después, se mezcló el contenido con 100 mL de agua destilada dentro de un vaso de precipitación de $250 \pm 0,5$ mL. La muestra fue expuesta a calor por 25 minutos con agitación constante de 600 rpm en una plancha de calentamiento y agitación SCILOGEX MS-H280-Pro. Al mismo tiempo fue necesario observar con un termómetro de mercurio (rango: -10°C a 400°C) que la temperatura se mantenga aproximadamente a 65°C . Seguidamente, se utilizó papel filtro sobre un embudo de vidrio para filtrar la solución y almacenarla en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

2.1.2 Elaboración de la disolución de nitrato de plata ($AgNO_3$)

Antes de realizar la síntesis fue necesario preparar una disolución que contenga plata. Por eso, se preparó 1000 mL de una solución acuosa de nitrato de plata a una concentración de 0,005 M. Esto se realizó al pesar 0,8493 g, 0,005 mol de nitrato de plata en una balanza analítica RADWAG AS 220 R2, posteriormente se mezcló con agua destilada en un matraz aforado de 1000 mL.

2.1.3 Elaboración de la disolución de nitrato de zinc $Zn(NO_3)_2$

En este caso, se pesó 0,1487 g, 0,0005 mol de nitrato de zinc en una balanza analítica RADWAG AS 220 R2, con la finalidad de desarrollar una disolución de 100 mL a una concentración de 0,005 M de nitrato de zinc en un matraz aforado de 100 mL.

2.1.4 Síntesis de nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Este proceso consistió en mezclar 55 mL de la disolución del extracto y 1000 mL de la disolución de nitrato de plata en un vaso de precipitación de 1000 mL. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción espontánea durante 24 horas a temperatura ambiente en un lugar oscuro a fin de evitar la fotoactivación del nitrato de plata. Además, la disolución fue expuesta a una agitación constante de 700 rpm empleando una plancha de agitación SCIOLOGEX MS-H280-Pro. Luego de la reacción, se vertió el contenido en un balón de vidrio de 1000 mL y se conectó al rotaevaporador IKA RV3 con la finalidad de retirar la mayor cantidad posible de líquido de la mezcla. Dado que el solvente era agua, la rotaevaporación se realizó al vacío con una temperatura de 45°C y 90 rpm. El proceso se detuvo cuando el volumen final de la mezcla fue aproximadamente $\frac{1}{4}$ del valor inicial.

Al finalizar la primera separación, se procedió a usar la centrifuga BIOBASE con rotor para tubos de 50 mL para separar aún más el agua presente en la muestra. El proceso se realizó durante 10 min a 4000 rpm. Al culminar la centrifugación, se realizaron tres lavados con agua desionizada a las nanopartículas obtenidas y se las colocó en un crisol de 50 mL de capacidad. Finalmente, se llevaron las nanopartículas a la estufa BARNSTEAD-M100, en donde se mantuvieron aproximadamente por 16 horas a una temperatura de 70°C hasta ser retiradas para pesarlas en la balanza analítica RADWAG-AS 220 R2 y luego, almacenarlas.

2.1.5 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs)

La síntesis se dio al fusionar la disolución de nitrato de zinc con 43 mL de la disolución del extracto. La reacción se mantuvo a 60°C con agitación constante de 500 rpm durante 2 horas en una plancha de calentamiento y agitación SCILOGEX MS-H280-Pro. Una vez culminada la reacción, se dejó enfriar y luego se ajustó el pH de la mezcla a una solución neutra ya que inicialmente estaba ácida. El ajuste se realizó con 5 mL de disolución 0,5 M de Hidróxido de sodio (NaOH).

Al terminar el ajuste de pH, se procedió a separar las fases usando una centrifuga BIOBASE a una revolución de 4000 rpm durante 15 min. Asimismo, fue necesario aplicar tres lavados con agua desionizada para eliminar impurezas. Luego, las nanopartículas se colocaron en una estufa BARNSTEAD M100 con la ayuda de un crisol de 50 mL de capacidad durante 16 horas a una temperatura aproximada de 70 °C. Finalmente, fueron retiradas para ser pesadas en la balanza analítica RADWAG AS 220 R2 y luego, almacenadas.

2.2 Caracterización de las Ag-NPs y ZnO-NPs

El método aplicado fue espectroscopía de UV-Visible (UV-Vis), el mismo que se desarrolló a temperatura ambiente, empleando la muestra de la síntesis de nanopartículas al terminar la reacción. Para utilizar el UV-Vis, primero se colocó agua destilada en una celda de cuarzo a fin de representar el blanco que a su vez implica la línea base de la medición. Luego, se realizó una disolución con 1 mL de la muestra de la síntesis y 9 mL de agua de destilada. Esto se hizo con la finalidad de evitar una sobresaturación en la medición de la absorbancia del equipo Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer, cuyo valor limite es de 5 uA.

Al colocar en la celda la muestra diluida, se procedió a leerla usando los parámetros mostrados en la tabla 2.1 para un estudio de barrido. De esta manera, se obtiene una gráfica que permitía identificar la presencia de nanopartículas de plata por la aparición de un pico en un rango de longitud de onda. El valor referencial empleado para identificar la presencia de nanopartículas de plata se encuentra en un rango de longitud de onda de 400 a 600 nm mientras que el valor referencial para las nanopartículas de óxido de zinc está entre 300 y 700 nm.

Tabla 2.1 Parámetros empleados en el espectrofotómetro para la caracterización de las nanopartículas de plata y óxido de zinc

Parámetro	Valor
Modo de medición	Absorbancia
Longitud de onda de inicio	200,0 nm
Longitud de onda final	600,0 nm
Velocidad de barrido	Medio
Intervalo	1,0 nm

2.3 Disolución de las nanopartículas con solvente Polyvinylpyrrolidone

Antes de aplicar las nanopartículas sobre los microorganismos es necesario preparar una disolución y determinar su concentración.

Primero, se realizó una disolución de 5 mL de Polyvinylpyrrolidone (Povidona) MW 40000, pesando 0,91 g, 0,008 mol en una balanza Mettler Toledo B2002-S y se agregó en un matraz de Erlenmeyer de $25 \pm 0,01$ mL con agua ultrapura tipo III. Luego, se procedió a medir en la misma balanza 10 mg de nanopartículas. Al terminar, con la ayuda de una pipeta de $1000 \pm 0,1$ μ L se añadió 990 μ L de la disolución de povidona en un tubo Eppendorf de 2 mL. Posteriormente, se agregaron 10 mg de nanopartículas y se mezcló haciendo uso de un agitador y un sonicador VWR Symphony Ultrasonic Cleaner durante 10 minutos. Finalmente, se obtuvo una solución de nanopartículas a una concentración de 10000 ppm.

2.4 Evaluación inhibitoria de las nanopartículas frente a los microorganismos

El desarrollo de la experimentación de inhibición se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ubicado en la Facultad Ciencias de la Vida en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

2.4.1 Cultivo de microorganismos

Para el cultivo de los hongos, se utilizó medio líquido y sólido con la finalidad de escoger aquel con mejor crecimiento de cepa. En el caso del caldo, primero se tajó un cuadro pequeño donde había la mayor cantidad de micelios con un bisturí esterilizado desde una placa Petri agar de 100 x 15 mm con el organismo sembrado. Luego, se procedió a introducir el

cuadro en una fiola Erlenmeyer de $100 \pm 0,01 \text{ mL}$ con 60 mL de medio líquido. El matraz sellado con papel aluminio y papel film fue colocado en un agitador de incubadora Innova-40 a 28°C con revolución de 100 RPM por 3 días.

Con el medio sólido solo se refrescó los microorganismos en una nueva placa Petri con agar PDA y se dejó incubar a 28°C por 3 días. Aunque, con el patógeno *Pseudocercospora fijiensis* fue necesario incubar durante 1 mes. Los aislados fueron extraídos de diferentes provincias; Guayas, Manabí, los Ríos y de diferentes haciendas o cultivos. La tabla 2.2 muestra una recopilación de los escenarios de crecimiento para cada microorganismo.

Tabla 2.2 Resumen de las condiciones de crecimiento de cada microorganismo

CONDICIONES	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma spp</i>	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>
MEDIO	Potato Dextrose Broth	Potato Dextrose Broth	Potato Dextrose Agar
TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	28	28	28
TIEMPO (h)	72	72	720
AGITACIÓN (RPM)	100	100	-

2.4.2 Suspensión y determinación de la concentración de los microorganismos

La obtención del extracto concentrado denominado stock en este proyecto, se lo obtuvo de dos formas considerando lo mencionado recientemente. Por un lado, se filtró el contenido del matraz en un frasco esterilizado con cuatro capas de papel filtro usado como colador y se vertió el filtrado en un tubo cónico Falcon™ de 50 mL, luego se hizo suspensiones de 1:10 (9 mL H_2O y 1 mL stock) y 1:100 (9 mL H_2O y 1 mL disolución anterior) con la finalidad de disminuir la concentración del stock para facilitar el conteo de los micelios. Por otro lado, se inundó la placa refrescada con 8 mL de tween-20 y con una pipeta de $1000 \pm 0,1 \mu\text{L}$, se extrajo el stock para hacer las disoluciones. Esto se realizó con cada aislado de *Fusarium*, *Trichoderma* y *Pseudocercospora*, pero en este último, se cortó toda la biomasa que creció en la placa para luego ser triturado en un tubo DT-20M esteril mediante una trituradora YBotech a 600 rpm por 20 segundos, posteriormente, se filtró el stock y se siguió los mismos pasos.

El recuento de esporas se realizó en el microscopio Axioskop 2 Plus con la cámara de Neubauer para establecer la concentración que tenía cada stock. Primero, se fijó el objetivo 10X del microscopio para localizar la zona de recuento (uno de los cuadrados grandes). La cámara de Neubauer contiene 8 cuadrados grandes y en cada uno 16, por tanto, se estableció el número de conteo luego de revisar la presencia de los hongos en los 16 cuadrados y así establecer un solo número por cada cuadrado grande. Luego, para contar se cambió al objetivo 40X, permitiendo una mejor apreciación de las esporas/micelios. Se colocó 20 µL de la muestra biológica en el interior de la cuadrícula y se tapó cuidadosamente con una placa cubre objeto. Rápidamente se contabiliza el número de células visibles en cada cuadrado y con ello se obtiene un valor promediado que es multiplicado por 10000 debido a las dimensiones de la cámara (1mm x 1 mm x 0,1 mm).

2.4.3 Incubación del microorganismo con el fungicida.

La evaluación de inhibición se la analizó siguiendo la metodología de los ensayos colorimétricos (absorbancia) mediante microplacas de poliestireno transparente de 96 pocillos Corning™. Considerando sus filas como el rango de concentración de Ag-NPs y ZnO-NPs en ppm y en las columnas los aislados de cada microorganismo por triplicado como se aprecia en la tabla 2.3. Cada pocillo contiene 100 µL de solución distribuido de la siguiente manera; 10 µL de aislado + 75 µL de medio Líquido Mueller Hinton Broth (MHB) + 15 µL Ag-NPs o ZnO-NPs.

Tabla 2.3 Diseño de la placa de micropocillos para hacer el análisis de inhibición

Concentración ppm	Aislado 1			Aislado 2			Aislado 3			Ctrl +	Ctrl -
C1										Aislado 1	
C2											
C3											
C4										Aislado 2	
C5											
C6											
C7										Aislado 3	
C8											

Primero, se diseminó los aislados a una concentración inicial de 1×10^4 g. mL^{-1} con 0,05% tween-20 en tubos cónicos Falcon™ de 15 mL para los hongos, utilizando la ecuación 2 de disoluciones y con ello se creó una línea base con medio MHB para agregar directamente 85 μL de esta mezcla a cada pocillo con una pipeta electrónica multicanal marca eppendorf modelo Xplorer de 50 – 1200 μL . En el caso de *Pseudocercospora*, se utilizó el medio PDB. Segundo se realizó las disoluciones de las Ag-NPs y ZnO-NPs a diferentes concentraciones usando nuevamente la ecuación 2 (25, 12,5, 6,3, 3,1, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 ppm para Ag-NPs y 1000, 500, 250, 125, 62, 31 ppm para ZnO-NPs) y se adicionó a los pocillos mezclando los 15 μL con ayuda de una pipeta de 20 ± 1 μL . Además, se incluyó el control negativo (85 μL de MHB y 15 μL AgNPs) y positivo (100 μL de solo medio líquido con microorganismo) en las últimas columnas de la placa para luego hacer la respectiva comparación de colorimetría. Es importante mencionar que inicialmente se realizó un ensayo piloto, donde el rango de concentración de Ag-NPs y ZnO-NPs fue más amplio desde 1000 ppm hasta 0,01 para determinar los límites adecuados. Esto se desarrolló con las especificaciones mencionadas anteriormente. Tercero, se dejó incubando durante 54-120 horas en una incubadora a 28°C. Por último, luego de ese tiempo se agregó el reactivo azul de Alamar asépticamente en una cantidad igual al 10% del volumen de los pocillos, es decir 10 μL y nuevamente se dejó incubando durante 2-4 h en la misma incubadora. El tiempo óptimo de incubación varía de acuerdo con el tipo de microorganismo y densidad de siembra.

Ecuación 2. Ecuación del cálculo de concentración y volumen en disoluciones

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

2.4.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Una vez que el contenido de los pocillos haya cambiado de coloración, se colocó la placa en el lector de placas marca BioTek, modelo Synergy HT para determinar la cantidad de organismos que preexisten de acuerdo con el espectro que tenga a través de la ayuda del software Gen5 1.07. Por último, se aplica la ecuación 1 para establecer el porcentaje de inhibición de acuerdo con cada concentración de Ag-NPs y ZnO-NPs, siendo este el contraste

a lo que se obtiene al aplicar la fórmula, ya que este determina el porcentaje de reducción de oxigenación de los hongos. La obtención de los resultados de CMI se realizó en una hoja Excel, al trasladar los valores de absorbancia obtenidos de la espectrometría y determinar el porcentaje de inhibición con respecto a cada concentración de nanopartículas. Se determinó, que el CMI del fungicida es cuando no hay oxigenación del hongo, es decir, cuando el pocillo tiene una coloración azul claro. Adicional a esto, para establecer la concentración letal media LC50, se utilizó el programa Kyplot 6.6. En donde una vez concluido los análisis y obtenido los resultados del porcentaje de oxigenación en cada pocillo de acuerdo con la concentración de las nanopartículas, se procedió a ingresar los datos al programa, con la finalidad de determinar la concentración letal media de estos fungicidas por medio del método Logit. Es un tipo de análisis de regresión lineal que predice el resultado de una variable categórica en función de las variables independientes.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Elaboración de nanopartículas

3.1.1 Síntesis de nanopartículas de plata

Al desarrollar la síntesis de nanopartículas de plata se evidenciaron cambios cualitativos en la disolución luego de culminar las 24 horas de reacción, tal como ilustra la figura 3.1, inicialmente la coloración de la mezcla fue marrón, siendo predominante el color del extracto. Sin embargo, al terminar la reacción el color de la mezcla cambió a verde esmeralda. Esto ocurrió debido a la reducción del ion plata de Ag^+ a Ag^0 . El color final de la reacción depende de la concentración inicial de la disolución del reactivo y del extracto empleado. Es decir, al emplear otro extracto con la misma concentración del reactivo no garantiza que al final tenga la misma coloración.

Luego de secar por completo las nanopartículas y almacenarlas, se observó ciertos cambios. La coloración de las nanopartículas resultó oscura con una textura suave como la del suelo arenoso y un ligero brillo escarchable. Esta síntesis se desarrolló por triplicado, obteniendo los siguientes pesos en cada uno de los procesos 0,4020, 0,4987 y 0,4128 g, que al promediar dio como resultado 0,4378 g y un rendimiento de 81,18%.



Figura 3.1 Coloración de la disolución de nanopartículas de plata luego del período de reacción.

3.1.2 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc

La síntesis de nanopartículas de óxido de zinc se realizó en menor tiempo comparado al de plata, por tanto, los cambios visibles se dieron más rápido. De igual manera, la coloración inicial fue marrón debido al extracto, figura 3.2. Al culminar la reacción no se observó cambio significativo. Los cambios cualitativos de la mezcla luego de la reacción fueron más evidentes al aplicar la disolución de hidróxido de sodio para ajustar el pH hasta 7, esto debido a que inicialmente este valor era 4,5. El cambio de coloración fue de marrón a naranja claro, figura 3.2. Al igual que las nanopartículas de plata, estas presentaron una textura suave, pero con coloración marrón.

La síntesis de nanopartículas de óxido de zinc se desarrolló por triplicado, obteniendo los siguientes pesos, 0,3631, 0,3607 y 0,3471 g. Una vez promediado los valores, el cual fue 0,3569 g se calculó el rendimiento de la síntesis, siendo este 87,70%.



Figura 3.2 Coloración de la disolución de nanopartículas de óxido de zinc luego del período de reacción y después del ajuste de pH.

3.2 Caracterización de nanopartículas

3.2.1 Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis)

3.2.1.1 Nanopartículas de plata (Ag-NPs)

Se aplicó la metodología UV-Visible en el extracto y reactivo antes de la reacción, tal como ilustra la figura 3.3. En el análisis del extracto se observa que no hay picos significativos que indiquen la presencia de metales en el rango de longitud de onda de 300 a 600 nm. Sin embargo, sí es posible observar una absorbancia elevada en el rango de 200 a 300 nm, debido a la intensidad de color que posee el extracto inicialmente. Por otra parte, el análisis del nitrato de plata presenta un valor similar al blanco de la metodología (agua destilada), debido a que no

posee coloración alguna; es transparente.

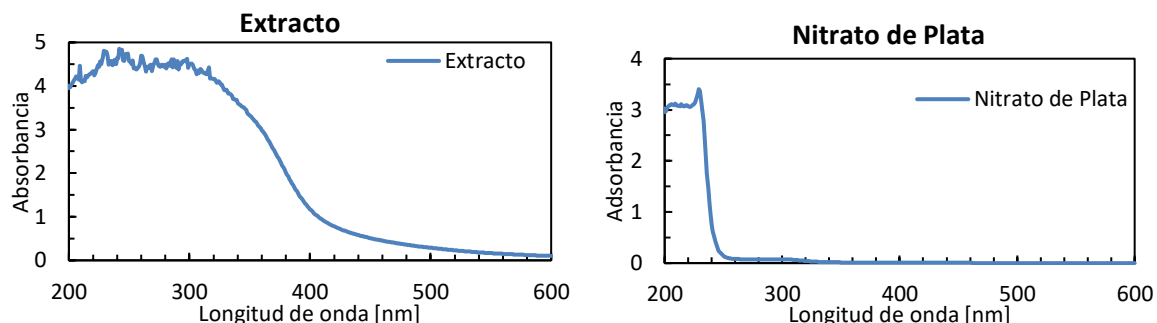


Figura 3.3 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de la disolución del extracto y del reactivo

El análisis espectrofotométrico de las de Ag–NPs presentó picos en el rango de longitud de onda 400 a 500 nm, figura 3.4. El análisis se realizó por triplicado obteniendo las siguientes longitudes de onda, 444, 445 y 464 con valores de absorbancia de 1,462, 1,608 y 3,348 respectivamente. Esto indica la presencia de nanopartículas de plata con un tamaño promedio de 23 nm de acuerdo con la referencia bibliográfica consultada (Kelly et al., 2003).

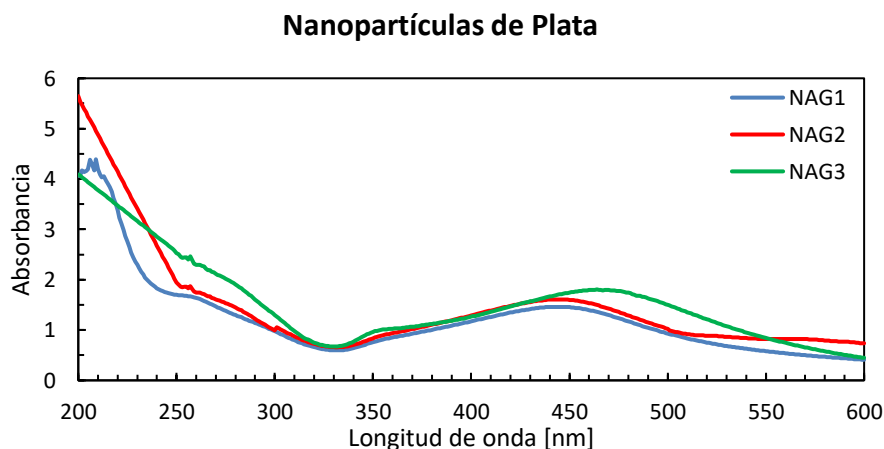


Figura 3.4 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de plata.

3.2.1.2 Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs)

Al igual que el caso anterior, se aplicó la técnica uv-Vis en el extracto y reactivo, figura 3.5. El análisis de la disolución del extracto es igual al caso anterior, ya que el extracto empleado es exactamente igual. Sin embargo, para el análisis del nitrato de zinc se puede observar una diferencia respecto al de plata. Hay un pico en el rango de longitud de onda de 250 a 350 nm. Esto ocurrió porque la disolución de nitrato de zinc presenta turbidez, lo cual no la vuelve una disolución completamente transparente.

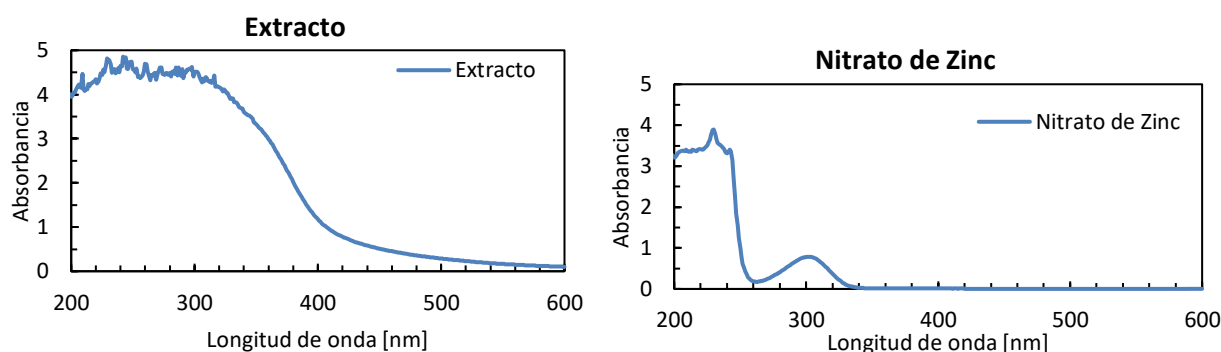


Figura 3.5 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de la disolución del extracto y del reactivo.

Este análisis también se realizó por triplicado obteniendo las siguientes longitudes de onda, 309, 349 y 430 con los valores de absorbancia de 0,822, 0,894 y 0,597 respectivamente. Esto indica la presencia de nanopartículas de óxido de zinc en las muestras analizadas, aunque la absorbancia es menor a las referenciadas. (Muñoz-Echeverri et al., 2021). Su tamaño promedio de nanopartículas es aproximadamente 7 nm de acuerdo con la cita (Kelly et al., 2003).

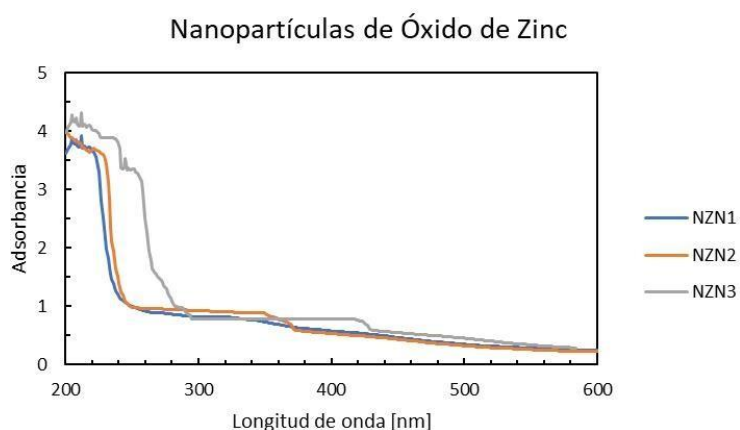


Figura 3.6 Espectro UV-Visible (UV-Vis) de las nanopartículas de óxido de zinc.

3.2.2 Microscopio electrónico de barrido SEM por sus siglas en inglés

3.2.2.1 Nanopartículas de plata (Ag-NPs)

En este estudio, se observan partículas con morfología cuasi-esférica ligeramente aglomeradas, figura 3.7. Su tamaño varía de 5 a 100 nm, lo que confirma la presencia de nanopartículas de acuerdo con la referencia (Rodríguez-Félix et al., 2021), ya que comparten el mismo tamaño a pesar de que usa como extracto los desechos de cártamo y demostraron

tener una buena actividad antimicrobiana. El recubrimiento con sombras oscuras en la superficie de la nanopartícula se debe a la presencia de materiales secundarios, como los biocompuestos presentes en el extracto de hoja.

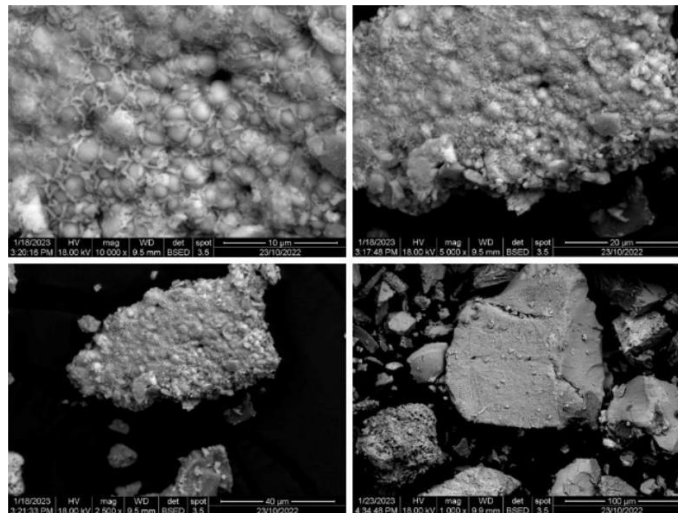


Figura 3.7 Micrografía SEM de nanopartículas de plata sintetizadas verdes.

3.2.2.2 Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs)

De acuerdo con el estudio de microscopía electrónica de barrido, la morfología que predomina en las nanopartículas de Óxido de zinc es la esférica con varios agregados irregulares formados alrededor de estas, tal como se observa en la figura 3.8. El tamaño promedio de las nanopartículas se encuentra en un rango de 5 a 100 nm. Estos resultados se encuentran dentro del rango reportado por (Dobrucka & Długaszewska, 2016) cuyos valores van de 30 a 110 nm, además de poseer una morfología similar.

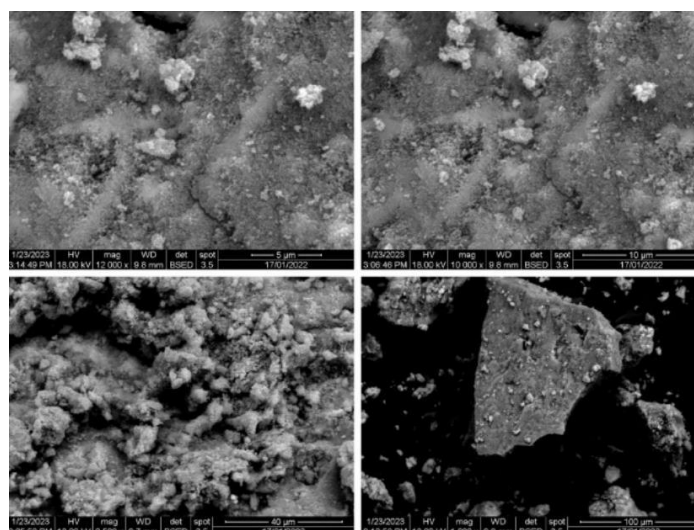


Figura 3.8 Micrografía SEM de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas verde.

3.3 Análisis del inoculo con las nanopartículas (Ag-NPs y ZnO-NPs)

Mediante la experimentación *in vitro* se logró demostrar que la hipótesis planteada inicialmente es válida. Sin embargo, se observó un comportamiento variado entre los aislados de cada hongo.

3.3.1 Cultivo de aislados

Al trascurrir los días de incubación de los hongos, se determinó que los aislados de *Fusarium-oxysporum* y *Trichoderma-spp* tienen un crecimiento radial con micelio algodonoso y diferente pigmentación, desde una coloración blanquecina, rosado hasta rojo vino y a partir de verde, esmeralda y helecho en *Trichoderma*, como muestra la figura 3.9 y 3.10. La misma coloración, se observó con el medio líquido salvo que había crecimiento ramificado heterogéneo y encapsulado.

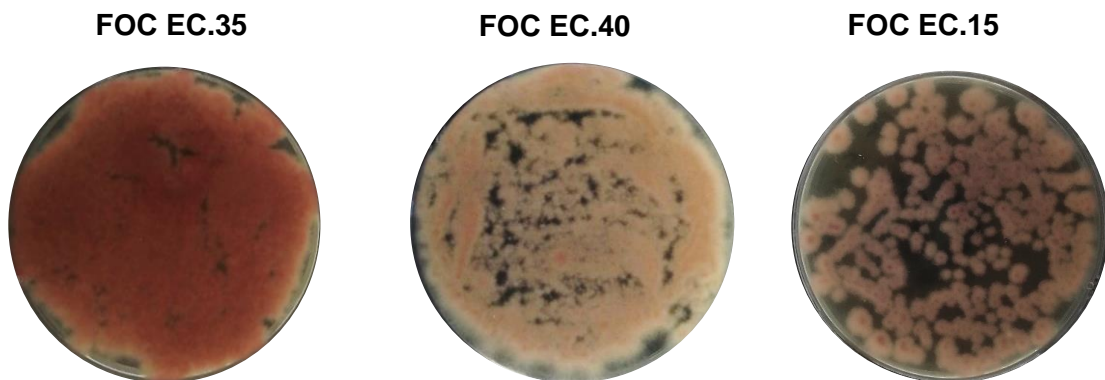


Figura 3.9 Crecimiento de los aislados de *Fusarium*.



Figura 3.10 Crecimiento de los aislados de *Trichoderma*.

El crecimiento de *P. fijiensis* fue lento hasta los 14 días y después aumentó constante las colonias con forma irregular y bordes blanco. La coloración fue gris-oscuro y algunas blanco-rosado con apariencia algodonosa, figura 4.



Figura 3.11 Crecimiento de los aislados de *Pseudocercospora*.

3.3.2 Establecer la concentración de cada especie

En el microscopio se identificó la presencia de fusarium por las microconidios de forma ovalada o elíptica de color rosada y cremosa. De la misma forma, se apreció las colonias de *trichoderma* en el equipo salvo que la coloración fue un contraste entre transparente y verde claro. En el caso de *Pseudocercospora* se observó micelios con forma ramificada y tamaño variado de coloración humo claro.

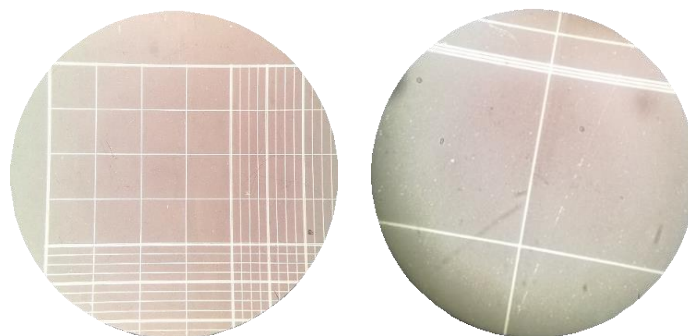


Figura 3.12 Visualización del microscopio con el objetivo 10X y 40X

En cada aislado se utilizó suspensiones diferentes, ya que en algunos casos el stock estaba muy concentrado o diluido. Por lo general, con el caldo se obtuvo soluciones más concentradas a diferente del medio sólido. Sin embargo, al raspar suavemente el hongo sembrado en la placa Petri con una aza permitió incrementar la concentración del stock, así que cualquiera de los dos métodos es adecuado.

3.3.3 Determinar la concentración mínima inhibitoria de las Ag-NPs y ZnO-NPs

A la concentración mínima de 25 ppm las nanopartículas de plata son capaces de eliminar el 100% de la presencia de los aislados del hongo *Fusarium*, aunque ciertos aislados presentaron resistencia, de igual la inhibición fue alta, por tanto, al promediar los aislados dio una eliminación total. Adicional, se determinó que a 1,05 ppm es factible eliminar la mitad de la población del hongo con una dispersión de 0,5. En anexos se puede observar el desglose de estos resultados y los gráficos correspondientes a la supervivencia de cada microorganismo expuesto a la tecnología nano.

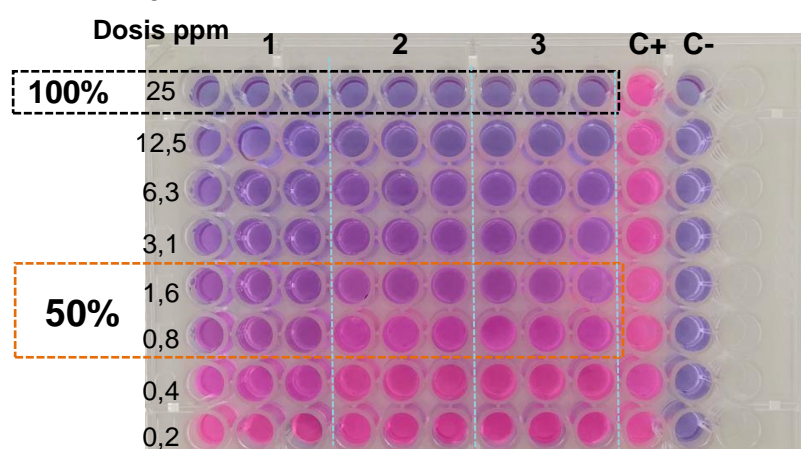


Figura 3.13 Propiedad inhibitoria de las Ag-NP frente a los aislados de *Fusarium*: 1. FOC.EC 15, 2. FOC.EC 40 y 3. FOC.EC 35. Los controles positivo y negativo están marcados respectivamente con la leyenda C+ y C-. Con una completa inhibición a 25 mg.L⁻¹ y una concentración letal media a 1,05 mg.L⁻¹

Tabla 3.1 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.

Concentración- (ppm)	Valores de Absorbancia										
	FOC-EC.15			FOC-EC.40			FOC-EC.35			CTR+	CTR-
25	262	247	274	384	392	403	495	466	443	5739	254
12,5	651	564	693	961	1090	896	1281	976	1205	5152	220
6,3	1004	1710	1052	1151	1268	1056	1846	1120	1864	5933	214
3,1	1754	1848	1439	2880	1838	1642	2841	2014	2072	5906	215
1,6	2083	2337	1942	3925	2908	2000	3504	3069	3352	6471	213
0,8	2426	2582	2608	4478	3303	3622	3929	4836	4141	5575	210
0,4	3655	3648	3387	4955	3937	4932	4417	5050	4957	6528	209
0,2	4233	4620	4618	5113	4734	4939	4976	5622	5592	5721	205

Tabla 3.2 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.

Concentración -(ppm)	Valores de Absorbancia							
	FOC-EC.19			FOC-EC.16			CTR+	CTR-
25	266	228	253	215	203	233	4739	241
12,5	401	443	410	378	376	396	5052	234
6,3	841	914	893	587	601	593	4633	214
3,1	1519	1248	1631	1345	1450	1367	4806	221
1,6	1783	1899	1908	1967	2045	2145	5471	219
0,8	2208	1974	2217	2457	2543	2167	5575	211
0,4	2988	2425	2701	3678	3589	3421	6028	205
0,2	3539	3116	3895	4465	4896	4504	5721	205

Tabla 3.3 Tabla de resultado total del microorganismo *Fusarium oxysporum*

Concentración- (ppm)	<i>Fusarium</i>		
	Promd	D.E.	% Inhibición
25	1,1875	1,7581	100
12,5	8,7042	5,6920	91
6,3	16,1539	6,1943	84
3,1	28,8128	5,5587	71
1,6	40,8684	8,4324	59
0,8	51,2041	13,5084	49
0,4	66,2952	10,2036	34
0,2	80,2210	5,6460	20

En el caso del patógeno *Pseudocercospora*, la concentración mínima inhibitoria es 30 ppm aproximadamente, es decir requiere mayor concentración en comparación al hongo anterior, aunque no se trata de una diferencia significativa. Por otro lado, la concentración letal media LC50 de este patógeno es 1,74 ppm con una variación de 0,25.

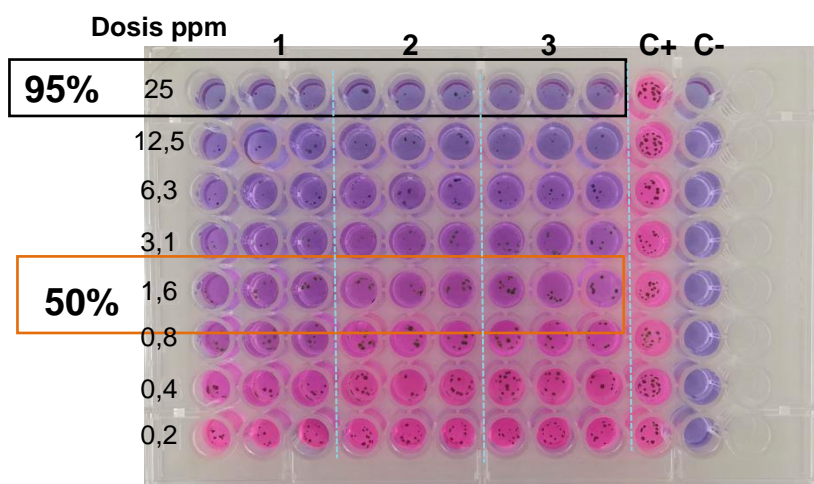


Figura 3.14 Propiedad inhibitoria de las Ag-NPs frente a los aislados de *Pseudocercospora*: 1. MF.IS 46, 2. MF.IS 45 y 3. MF.IS 7. Los controles positivo y negativo están marcados respectivamente con la leyenda C+ y C-. Con una inhibición del 95% a 25 mg.L⁻¹ y una concentración letal media a 1,75 mg.L⁻¹.

Tabla 3.4 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.

Concentración- (ppm)	Valores de Absorbancia										
	MF-IS.46			MF-IS.45			MF-IS.7			CTR+	CTR-
25,0	442	437	424	534	552	543	715	746	713	5629	254
12,5	851	864	893	961	1090	1036	1381	1476	1325	5942	220
6,3	1304	1510	1452	1601	1768	1636	1946	2020	1944	5323	214
3,1	1954	2048	1739	2280	2438	2342	2841	2914	2842	5806	215
1,6	2583	2737	2942	3025	3108	2990	3504	3669	3432	5671	213
0,8	3326	3682	3508	4078	4203	4122	4329	4536	4621	6575	210
0,4	3955	4318	4187	4655	4937	4932	5417	5550	5367	6528	209
0,2	4853	5020	4918	5413	5534	5339	6176	5922	6092	6721	205

Tabla 3.5 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.

Concentración- (ppm)	Valores de Absorbancia							
	MF-IS.15			MF-IS.5			CTR+	CTR-
25,0	526	518	553	515	503	533	4839	241
12,5	1001	1013	1010	978	966	1016	4752	234
6,3	1511	1464	1493	1587	1521	1693	4733	214
3,1	2019	2018	2011	2245	2210	2367	4906	221
1,6	2783	2699	2578	2967	2925	3045	5371	219
0,8	3408	3374	3217	3657	3573	3767	5775	211
0,4	4088	3925	3821	4478	4389	4521	5928	205
0,2	4439	4316	4345	4965	4896	5004	5821	205

Tabla 3.6 Tabla de resultado total del microorganismo *Pseudocercospora*

Concentración- (ppm)	<i>Pseudocercospora</i>		
	Promd	D.E.	% Inhibición
25	5,4340	1,5312	95
12,5	14,9838	2,5764	85
6,3	25,5354	2,1941	74
3,1	37,2031	3,7159	63
1,6	50,2699	2,6689	50
0,8	65,1510	3,2222	35
0,4	75,5015	3,6672	24
0,2	91,9408	2,2433	9

Con respecto a la CIM del hongo beneficiario es superior a 25 ppm, aproximadamente 45 ppm de acuerdo con las gráficas obtenidas y la supervivencia media del hongo es 4,74 ppm, con una desviación estándar de 0,6. Valores superiores en relación con los otros hongos, porque a 25 ppm en trichoderma, se observó un 17% de supervivencia.

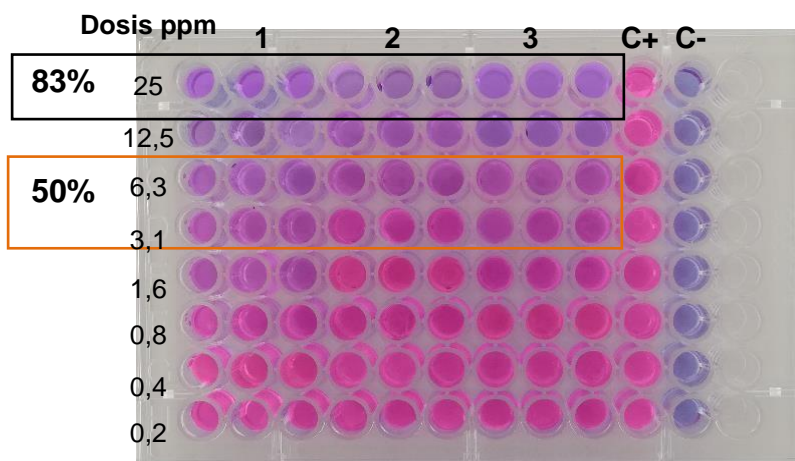


Figura 3.15 Propiedad inhibitoria de las Ag-NPs frente a los aislados de *Trichoderma*: 1. TH.BAM 15, 2. TH.BAM 3 y 3. TH.BAM 36. Los controles positivo y negativo están marcados respectivamente con la leyenda C+ y C-. Con una inhibición del 83% a 25 mg.L⁻¹ y una concentración letal media a 4,45 mg.L⁻¹

Tabla 3.7 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.

Concentración- (ppm)	Valores de Absorbancia										
	TH-BAM.15			TH-BAM.3			TH-BAM.36			CTR+	CTR-
25,0	423	417	408	1291	1346	1570	1111	1211	1093	1972	214
12,5	693	705	658	2098	2060	2216	1959	2049	2005	2177	191
6,3	905	897	875	2795	2648	2771	3522	3160	3130	1878	176
3,1	1273	1391	1220	3891	4095	3950	3844	3279	3501	5252	203
1,6	1415	1404	1389	4748	4376	4570	4063	3869	4046	5693	182
0,8	1636	1640	1582	5010	4953	4900	4298	4950	4883	6788	203
0,4	1822	1808	1769	5528	5366	5285	4963	5369	5252	5710	208
0,2	2029	2227	2091	6105	5965	5880	5302	5907	5678	5573	233

Tabla 3.8 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo.

Concentración (ppm)	Valores de Absorbancia							
	TH-BAM.21			TH-BAM.7			CTR+	CTR-
25,0	1325	1447	1564	1205	1364	1228	6188	214
12,5	1743	1851	1781	1674	1778	1683	6527	191
6,3	2358	2493	2417	2082	2175	2297	5963	176
3,1	3631	3774	3560	3547	3613	3475	6452	203
1,6	4422	4609	4544	4357	4511	4265	6093	182
0,8	5022	5234	5067	4775	4956	4884	6117	203
0,4	5737	5897	5939	5440	5768	5429	6054	208
0,2	6286	6533	6908	6085	6272	6308	6395	233

Tabla 3.9 Tabla de resultado total del microorganismo benéfico

Concentración- (ppm)	<i>Trichoderma</i>		
	Promd	D.E.	% Inhibición
25	17,4213	3,8180	83
12,5	29,1997	4,0114	71
6,25	42,1414	9,0562	58
3,125	60,1631	4,0519	40
1,5625	70,8863	3,5339	29
0,78125	80,7055	2,3499	19
0,4	90,7367	1,8104	9
0,2	102,5709	2,6975	0

En relación con las nanopartículas de óxido de zinc, se obtuvo que la concentración mínima inhibitoria de los 3 microorganismos es aproximadamente 1000 ppm. Aunque a esa concentración se observa una pequeña supervivencia del hongo beneficiario 8%. Asimismo, se analizó la concentración letal media, donde con *Fusarium* se obtuvo que la concentración adecuada es a 243,40 ppm para inhibir la mitad de la biomasa, *Pseudocercospora* es a 266,87 ppm y *Trichoderma* a 297,87 ppm, con dispersión muy variada como se observa en la última tabla de anexos, puesto que los rangos de análisis fueron muy amplios, debido a que estas nanopartículas no disponen de propiedades suficientes de inhibición.

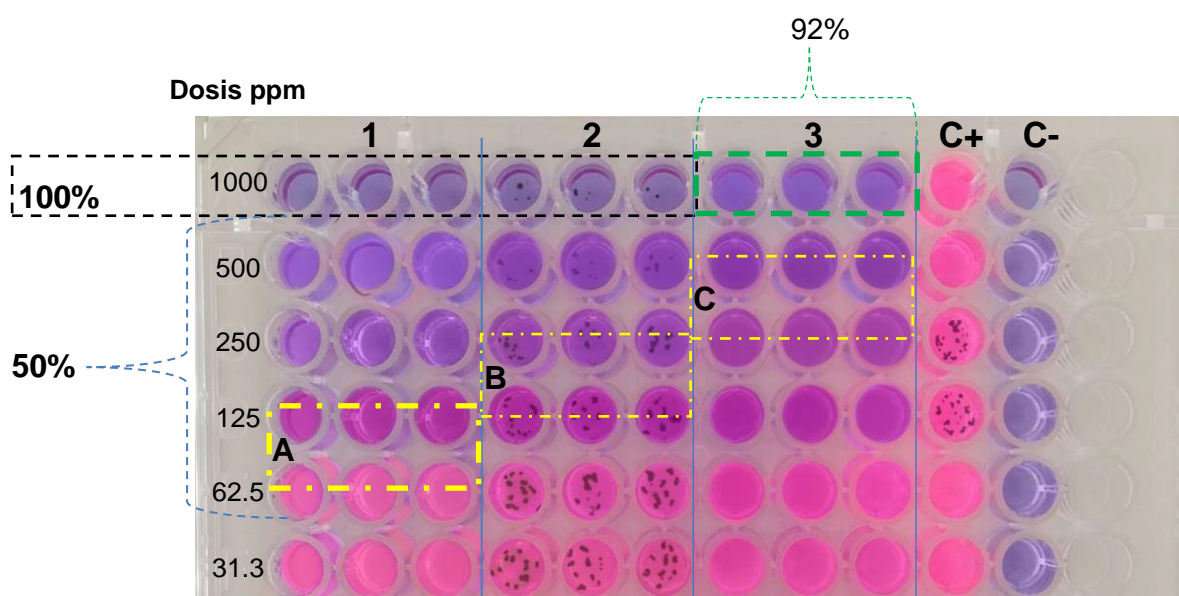


Figura 3.16 Propiedad inhibitoria de las ZnO-NPs frente a los microorganismos: 1. *Fusarium oxysporum*, 2. *Pseudocercospora fijiensis* y 3. *Trichoderma spp.* Los controles positivo y negativo están marcados respectivamente con la leyenda C+ y C-. Ambos patógenos tuvieron completa inhibición a 1000 mg.L⁻¹. En el caso de *Trichoderma* el máximo valor de inhibición fue del “92%” a la concentración de 1000 mg.L⁻¹. Los valores de la LC50 por especie fueron A) 123,4 mg.L⁻¹, B) 216,8 mg.L⁻¹ y C) 297,8 mg.L⁻¹

Tabla 3.10 Lectura del espectrómetro de acuerdo con la colorimetría del pocillo

Concentración- (ppm)	Valores de Absorbancia										
	FOC-EC.35			MF-IS.7			TH-BAM.3			CTR+	CTR-
1000,0	213	207	238	431	446	430	656	667	648	5972	214
500,0	1053	995	1128	1398	1460	1416	1467	1543	1498	5177	191
250,0	1950	2147	1845	2295	2148	2171	2328	2467	2376	5878	176
125,0	3273	3191	2920	3491	3595	3450	3456	3589	3523	5252	203
62,5	4115	4204	4089	4548	4376	4570	4667	4768	4698	5693	182
31,3	5936	5740	5582	5890	5953	6010	5789	5890	5876	6788	203

Tabla 3.11 Tabla de resultado total de los microorganismos con ZnO-NPs.

Concentración- (ppm)	FOC-EC.35			MF-IS. 7			TH-BAM.3		
	Promd	Desv. Estándar	% Inhibición	Promd	Desv. Estándar	% Inhibición	Promd	Desv. Estándar	% Inhibición
1000	0,098	0,301	100	3,891	0,157	96	8,111	0,175	92
500	15,820	1,216	84	21,568	0,558	78	23,915	0,697	76
250	32,814	2,788	67	35,373	1,379	65	40,263	1,284	60
125	53,447	3,376	47	57,971	1,309	42	60,659	1,215	39
62,5	71,974	1,098	28	75,336	1,854	25	82,440	0,942	18
31,25	101.407	3.240	0	100,701	1.052	0	103.216	1.000	0

El mecanismo de acción de las nanopartículas consiste en adherirse a la membrana celular y penetrar en el interior, desintegrando la pared celular, dañando las proteínas de la superficie, el ácido nucleico por la producción/acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres. Además, Ag-NPs provocan la acumulación de iones de plata, bloqueando la respiración por la salida de iones intracelulares y, por consiguiente, daña el sistema de transporte de electrones, matando las esporas (Mansoor et al., 2021).

Mediante la experimentación *in vitro*, se demostró que las nanopartículas de plata tienen un menor efecto inhibitorio sobre *Trichoderma*. De modo que, usando una disolución de Ag-NPs a 30 ppm podría controlar totalmente los patógenos (*Fusarium* y *Pseudocospora*) y con 17% de supervivencia del hongo biocontrolador (*Trichoderma*). Además, se estableció que a una concentración de 4,74 ppm se erradica solamente la mitad de la población del hongo beneficiario, pero elimina más del 50% de las colonias de los patógenos. Esto se justifica, debido a que *Trichoderma* tiene una gran capacidad de resistencia gracias a la producción de clamidospora en mayor cantidad con estructuras fuertes, en donde el hongo se encapsula con la finalidad de sobrevivir a cualquier condición. Mientras que los patógenos no son capaces de generar este recubrimiento de forma resistente. Aparte de esto, produce una gran cantidad de enzimas. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas le permite desarrollarse y crecer rápidamente, por ello, puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de defensivos agrícolas como las nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de óxido de zinc mostraron una baja actividad antimicrobiana en comparación a las de plata. Debido a que los iones Zn^{+2} actúan como agentes bacteriostáticos, los cuales se caracterizan por detener el crecimiento del hongo, de tal manera que acaban envejeciendo y muriendo sin reproducirse. Mientras que los iones Ag^+ son agentes biocidas especializados en destruir por completo los microorganismos.

Adicional a estos análisis, se considera detallar la desviación estándar obtenida y adjuntada en los anexos. Por un lado, la variación del triplicado de cada aislado está dentro del rango aceptable (menor a 1), pero al analizar entre los aislados de cada microorganismo, se observa mucha dispersión. Esto se justifica por muchas razones; ya sea el lugar de extracción, las condiciones, período de incubaciones, y sobre todo el método de adaptabilidad que desarrolle cada aislado con las nanopartículas. Por otro lado, las gráficas de concentración letal media muestran la tolerancia de cada aislado de acuerdo con las concentraciones, donde a medida que incrementa la concentración de las nanopartículas disminuye el porcentaje de supervivencia.

3.1 Análisis de costo

El presente proyecto se ejecutó en laboratorios, por ende, los costos generados son estimados a nivel microescala, ya que la hipótesis se verificó mediante análisis *in-vitro*, es decir su producción no es a nivel comercial.

En cuanto a la síntesis de las nanopartículas es indispensable el uso de reactivos para incentivar la reacción. Por ello en la tabla 3.12, se muestra un desglose de los costos de cada reactivo. Aunque es necesario resaltar que para la síntesis de plata solo se utilizó 0,8493 g, 0,005 mol de $AgNO_3$ y 0,1487 g, 0,0005 mol de $Zn(NO_3)_2$. En el caso del reactivo Alamar-Blue se necesitó 10 μ L por cada pocillo. Por otro lado, el extracto ecológico no representa un gasto económico significativo, ya que, se utilizó como materia prima la hoja del árbol y el solvente universal (agua destilada). Asimismo, sucedió con los aislados, ya que fueron facilitados por parte del departamento de fitopatología del CIBE. Sin embargo, se debe

considerar los gastos que demanda mantener los aislados en la colección del CIBE.

Para identificar la estructura de las nanopartículas se consideró la técnica UV-vis, siendo un recurso económico y Microscopía electrónica de barrido. Con respecto al costo de las síntesis y análisis de inhibición, se lo estimó considerando fundamentalmente el desgaste de los equipos y el consumo de los servicios, pero también se incluyó el gasto de materiales, sobre todo aquellos que son desechados por ser de un solo uso.

Tabla 3.12 Costos de implementación del presente estudio

Parámetros	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Reactivos			
Nitrato de plata	25 g	\$50	\$50
Nitrato de zinc	50 g	\$21	\$21
Alamar-Blue	100 mL	\$550	\$550
TOTAL-REACTIVOS		\$621	
Caracterización			
Espectroscopía Uv-Vis	2	\$10	\$20
SEM	2	\$100	\$200
TOTAL-CARACTERIZACIÓN		\$220	
Síntesis y Análisis de inhibición			
Aislados	20	\$100	\$2000
Síntesis Ag-NPs	1	\$110	\$110
Síntesis ZnO-NPs	1	\$60	\$60
Análisis de inhibición	20	\$200	\$4000
TOTAL-SÍNTESIS Y ANÁLISIS		\$2370	
COSTO-TOTAL		\$7411	

A pesar, de que las ZnO-NPs generan menos gasto, se demostró que estas tienen poca capacidad inhibitoria, lo cual no logra compensar con el beneficio del costo. Por otro lado, las Ag- NPs tienen un mayor costo, pero una capacidad inhibitoria muy alta. Como la diferencia de gasto no es significativa, se considera más rentables las nanopartículas de plata.

Si bien comparamos las ganancias que generó la exportación de banano en el año 2022 (USD 2.783 millones) con el costo de implementación del presente proyecto, podemos asegurar que se trata de un estudio remunerador, relevante y significativo para erradicar las plagas que afectan la productividad y calidad de los cultivos. Por el momento es complicado comparar los precios con un fungicida convencional, puesto que el resultado de la síntesis da

una solución de 180 mL a una concentración muy alta (10000 ppm) y los pesticidas del mercado están a concentraciones muy bajas, por ello su costo es menor.

CAPÍTULO 4

4 Conclusiones Y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Se logró sintetizar satisfactoriamente las nanopartículas de plata y óxido de zinc empleando un extracto de hojas *Psidium guayaquilensis*. De acuerdo con los resultados obtenidos, el proceso con mayor rendimiento fue el de las nanopartículas de óxido de zinc con un 87,7% durante 2 horas de reacción a 65°C. Por otra parte, el rendimiento para las nanopartículas de plata fue de 81,18% en un tiempo de reacción de 24 horas a temperatura ambiente. Se aplicó la metodología UV-Visible para la caracterización, con esta se comprobó la presencia de nanopartículas en las muestras estudiadas y el tamaño de las partículas; Ag-NPs 23 nm, ZnO-NPs 7nm. Además, se observó que las nanopartículas de plata poseen una absorbancia mayor que las de óxido de zinc. Adicional se empleó la técnica SEM, donde se observó una morfología esférica irregular con aglomeración de partículas y un tamaño de 5 a 100 nm.
- El hallazgo *in vitro* demostró que las nanopartículas de plata y óxido de zinc tienen potencial para controlar los hongos de las plantaciones de banano y podrían ser aplicable en el campo. Sin embargo, tienen diferentes comportamiento o efecto inhibitor. Ambas nanopartículas tienen actividad antifúngica con los hongos patógenos a concentraciones menores 30 y 1000 ppm respectivamente, mientras que se necesita una disolución con mayor cantidad de nanopartículas de probablemente unos 45 y 1200 ppm respectivamente, para inhibir el organismo beneficiario, siendo capaz de tolerar el efecto de la nano-plata y óxido de zinc. De esta forma, se evidencia que al utilizar en laboratorio una disolución antimicrobiana de 30 ppm los microorganismos patógenos son inhibidos, mientras que algo de la biomasa del hongo benéfico logra sobrevivir.

- Luego de analizar los resultados inhibitorios de las nanopartículas frente a los hongos controlados, se determinó que la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata no afecta totalmente al microorganismo benéfico (*Trichoderma*), puesto que, a la concentración inhibitoria mayor a 25 ppm, los hongos patógenos mueren completamente, pero hay un 17% de supervivencia de los organismos biocontrol. En el caso de las nanopartículas de óxido de zinc ocurre lo mismo con la diferencia que requiere de mayor concentración. Por otro lado, la supervivencia media letal del beneficiario ocurre a una concentración de 4,5 ppm, con una inhibición superior al 50% de los patógenos.
- Las nanopartículas de óxido de zinc presentaron una efectividad muy baja al controlar los hongos que asechan a la industria bananera, puesto que, se necesita de una concentración muy alta (1000 ppm) para eliminar 100% la presencia de patógenos y en un rango de 240-300 ppm para erradicar la mitad de la población. Mientras que con las nanopartículas de plata solo se requiere de una disolución a 30 ppm para inhibir a los dos patógenos y en un rango de 1-4,5 ppm para controlar la mitad del crecimiento de sus biomásas. Con respecto, a *Trichoderma* se dio el mismo comportamiento con ambas nanopartículas, es decir, mantener mayor porcentaje de supervivencia a diferencia de los patógenos, aunque, las sintetizadas con nitrato de plata lograron conservar de mejor manera al hongo biocontrol.
- Este proyecto sobresale a otras investigaciones por que se sintetizó y analizó dos fungicidas ecológicos con tres hongos de mayor impacto en los cultivos de banano por su renuente presencia y afectación a las plantas. Además, este estudio da paso a los análisis in vivo, es decir con estos resultados ya se puede hacer pruebas en invernaderos con el fin de conocer cuan diferente, variado o si son los mismos resultados por el cambio de las condiciones climáticas.

4.2 Recomendaciones

- Se aconseja emplear una disolución de extracto fresca al momento de realizar la síntesis. Un extracto que lleva mucho tiempo en refrigeración puede generar saponinas las cuales causan espuma en la mezcla de la reacción. La espuma generada complica la separación con el agua en la etapa de la rotaevaporación provocando pérdidas mayores y poniendo en riesgo la integridad del equipo. Si llega a formarse saponinas lo ideal es tratar de separar primero con etanol o un reactivo como el polisorbato (tween 20) antes de aplicar rotaevaporación.
- Durante la etapa de separación del agua con la ayuda del rotaevaporador lo mejor es evitar rotaevaporar a sequedad, esto debido a que es más complicado retirar las nanopartículas adheridas de las paredes del balón volumétrico ocasionando pérdidas.
- Se recomienda realizar nuevos análisis de inhibición con las nanopartículas de óxido de zinc, pero ahora expuestas a la luz durante el período de incubación, ya que, por su acción fotocatalítica podría incrementar su efectividad antimicrobiana sobre los microorganismos estudiados.
- Se sugiere utilizar los resultados obtenidos *in vitro*; valor de concentración mínima inhibitoria y letal media, en pruebas de invernadero con la finalidad de definir dosis de aplicación en planta y fitotoxicidad y así, luego estudiar el comportamiento de las nanopartículas frente a las plantaciones de banano *in vivo* y determinar finalmente la calidad del producto.
- Se invita a desarrollar análisis microbiológicos a todas las especies consideradas en esta investigación, con el fin de analizar que estructuras tiene en particular cada una, provocando que algunas sean más resistentes a otras.

5 Referencias

- Al-Nasiry, S., Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22(5), 1304–1309. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem011>
- Angel David Hernández Amasifuen, A. J. P. L. & H. W. N.-C. (2019). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” *Capsicum annum* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *Laboratorio de Estudios Genéticos y Biotecnológicos, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Av. Mercedes Indacochea N° 609, Huacho, PERÚ*, 10–15.
- Baruzzi, F., Morea, M., Baruzzi, F., Quintieri, L., & Caputo, L. (n.d.). *Antimicrobial compounds produced by Bacillus spp. and applications in food*.
- Byth, H. A., Mchunu, B. I., Dubery, I. A., & Bornman, L. (2001). Assessment of a simple, non-toxic Alamar Blue cell survival assay to monitor tomato cell viability. *Phytochemical Analysis*, 12(5), 340–346. <https://doi.org/10.1002/pca.595>
- Chiriboga Graciela Gómez B Karla Garcés E, H. P., & Spp Para, T. (n.d.). *PROTOCOLOS PARA FORMULACIÓN Y APLICACIÓN DEL BIO-INSUMO: Con la colaboración del*
- Ciencias, en, en Ciencias, M., Titular, I., Rodríguez Martínez en Ciencias, C., & Zhurbenko, R. (n.d.). *MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO 2018*. www.biocen.cu
- Dobrucka, R., & Długaszewska, J. (2016). Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.05.016>
- Fakhari, S., Jamzad, M., & Kabiri Fard, H. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: a comparison. In *Green Chemistry Letters and Reviews* (Vol. 12, Issue 1, pp. 19–24). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1547925>
- Ing. Karely Chamé Fernández. (2013). *Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas*.
- Karina Guadalupe Espinosa Cavazos, A. S. G. A. O. C. F. (2021). Bio-síntesis de

- nanopartículas de Plata mediante el extracto de Geranium (Pelargonium spp. *Cuerpo Académico de Ciencia y Tecnología de Polímeros. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas. Saltillo, Coahuila. CP.25280, México.*
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., & Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>
- Kimunye, J., Were, E., Swennen, R., Viljoen, A., & Mahuku, G. (2021). Sources of resistance to *Pseudocercospora fijiensis*, the cause of black Sigatoka in banana. *Plant Pathology*, 70(7), 1651–1664. <https://doi.org/10.1111/ppa.13408>
- Mahdizadeh, V., Safaie, N., & Khelghatibana, F. (n.d.). Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. In *J. Crop Prot* (Vol. 2015, Issue 3).
- Malandrakis, A. A., Kavroulakis, N., & Chrysikopoulos, C. v. (2019). Use of copper, silver and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens. *Science of the Total Environment*, 670, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.210>
- Mansoor, S., Zahoor, I., Baba, T. R., Padder, S. A., Bhat, Z. A., Koul, A. M., & Jiang, L. (2021). Fabrication of Silver Nanoparticles Against Fungal Pathogens. In *Frontiers in Nanotechnology* (Vol. 3). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.679358>
- Mario Alejandro Cano. (2011). A REVIEW OF INTERACTION OF BENEFICIAL MICROORGANISMS IN PLANTS: Mycorrhizae, *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. *1Ingeniero Agrónomo. M.Sc. En Ciencias Agrarias. Docente Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, e-Mail: Mcano@udca.Edu.c, 7–13.*
- Muñoz-Echeverri, L., Campo-Avedaño, D., Hoyos-García, M., Obregón- Velázquez, M., Muñoz-Vergara, J., & Giraldo-Correa, G. (2021). Síntesis verde de nanopartículas de ZnO con actividad antibacteriana para funcionalizar textiles de algodón. *Informador Técnico*, 85(2). <https://doi.org/10.23850/22565035.3645>

Productividad, A., & Agroproductividad. (n.d.). DETERMINATION OF LC50 AND EC50 FROM ENDOSULFAN LACTONE AND DIAZINON IN EARTHWORM (*Eisenia foetida*) (Vol. 11).

Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>

Teruo Higa, P., por FUNDASES, T., Andrea Rueda Peña, P., Agrónoma, I., & en Ciencias Agrícolas, L. (n.d.). *MICROORGANISMOS BENÉFICOS Y EFECTIVOS PARA UNA AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE SOSTENIBLE.*

6 Anexos

6.1 Resultados del microorganismo patógeno (*Fusarium oxysporum*) con las Ag-NPs

Tabla 6.1 Porcentaje de supervivencia de los cinco aislados de *Fusarium* por triplicado

Concentración (ppm)	FOC EC.15			FOC EC.40			FOC EC.35		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
25	0,15	-0,13	0,37	2,27	2,41	2,60	4,11	3,61	3,22
12,5	8,00	6,38	8,78	12,86	15,09	11,73	17,97	12,80	16,68
6,3	14,65	27,73	15,54	16,24	18,27	14,59	27,61	15,33	27,92
3,1	28,54	30,28	22,70	46,20	28,13	24,74	44,44	30,44	31,42
1,6	34,66	39,37	32,05	64,32	46,70	30,97	55,67	48,31	53,10
0,8	41,05	43,94	44,42	73,92	53,57	59,09	62,88	78,21	66,46
0,4	63,83	63,70	58,86	82,18	64,55	81,78	71,14	81,84	80,26
0,2	74,55	81,71	81,68	84,93	78,37	81,92	80,60	91,51	91,00

Concentración (ppm)	FOC EC.19			FOC EC.16		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
25	0,55	-0,28	0,26	-0,48	-0,70	-0,15
12,5	3,65	4,57	3,85	2,64	2,60	2,96
6,3	13,65	15,24	14,78	6,80	7,06	6,91
3,1	28,30	22,39	30,74	20,52	22,44	20,92
1,6	34,09	36,61	36,81	31,90	33,32	35,15
0,8	43,45	38,36	43,64	40,93	42,49	35,64
0,4	60,47	48,23	54,23	63,22	61,60	58,54
0,2	72,44	63,25	80,17	77,54	85,39	78,25

Tabla 6.2 Tabla de promedio, desviación estándar y porcentaje de inhibición de cada aislado

Concentración (ppm)	FOC EC.15			FOC EC.40			FOC EC.35		
	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición
25	0,131	0,253	100	2,426	0,166	98	3,645	0,444	96
12,5	7,721	1,221	92	13,226	1,713	87	15,818	2,689	84
6,3	19,305	7,313	81	16,366	1,840	84	23,619	7,181	76
3,1	27,171	3,972	73	33,021	11,535	67	35,434	7,812	65
1,6	35,360	3,710	65	47,329	16,687	53	52,361	3,734	48
0,8	43,139	1,824	57	62,193	10,523	38	69,186	8,022	31
0,4	62,129	2,829	38	76,173	10,064	24	77,745	5,778	22
0,2	79,314	4,125	21	81,738	3,283	18	87,704	6,160	12

Concentración (ppm)	FOC EC.19			FOC EC.16		
	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición
25	0,175	0,423	100	-0,440	0,277	100
12,5	4,023	0,484	96	2,733	0,202	97
6,3	14,557	0,818	85	6,922	0,128	93
3,1	27,145	4,294	73	21,292	1,011	79
1,6	35,836	1,519	64	33,457	1,628	67
0,8	41,814	2,997	58	39,688	3,590	60
0,4	54,311	6,117	46	61,118	2,376	39
0,2	71,954	8,473	28	80,394	4,339	100

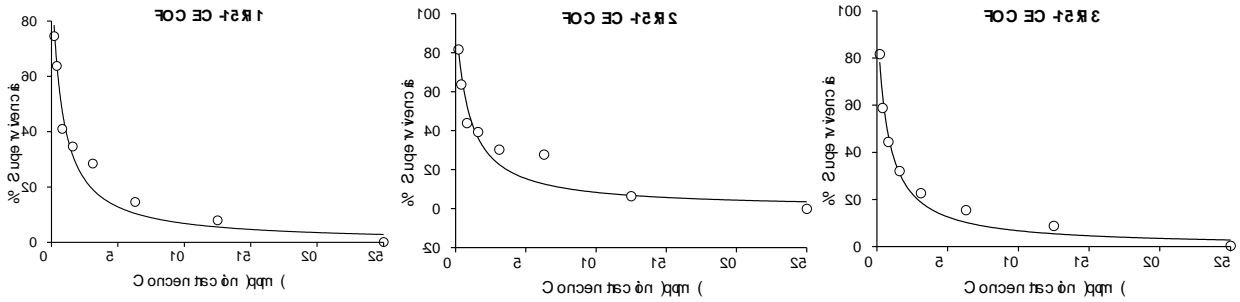


Figura 6.1 Representación gráfica del desarrollo de los aislados FOC.EC15 expuestos a las nanopartículas de plata.

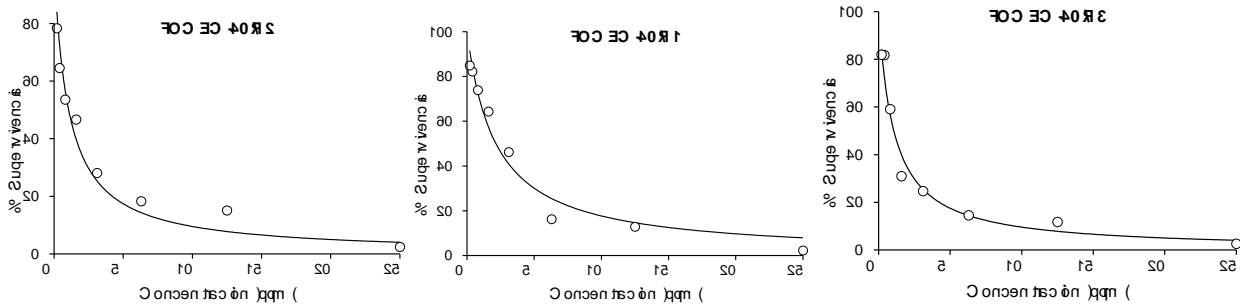


Figura 6.2 Representación gráfica del desarrollo de los aislados FOC.EC40 expuestos a las nanopartículas de plata.

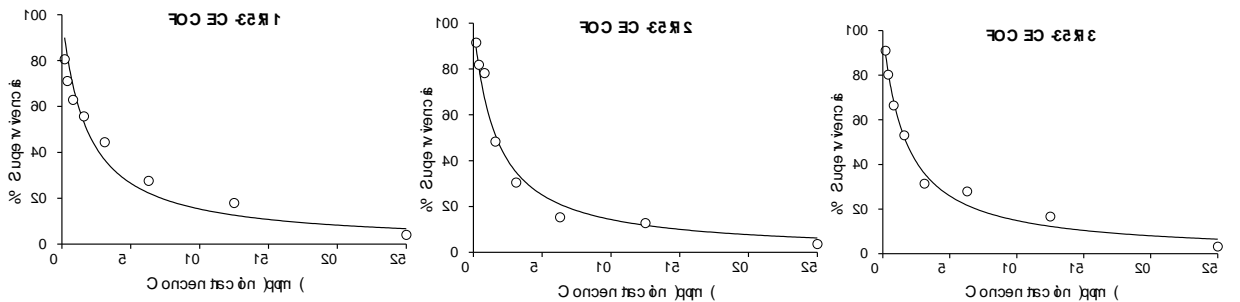


Figura 6.3 Representación gráfica del desarrollo de los aislados FOC.EC35 expuestos a las nanopartículas de plata.

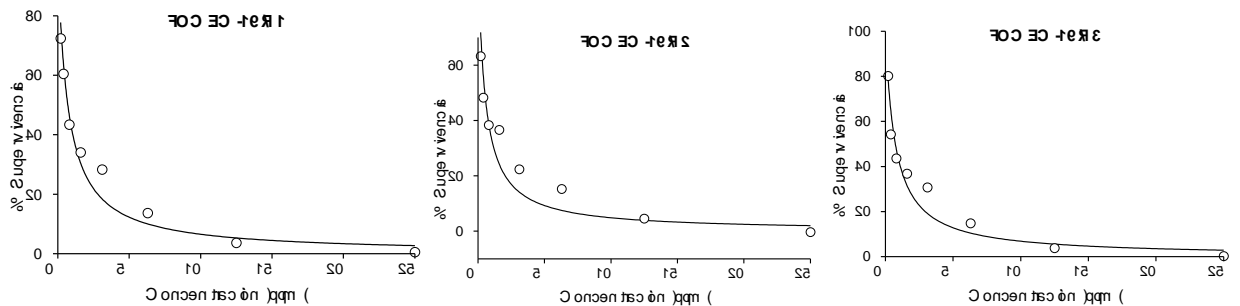


Figura 6.4 Representación gráfica del desarrollo de los aislados FOC.EC16 expuestos a las nanopartículas de plata.

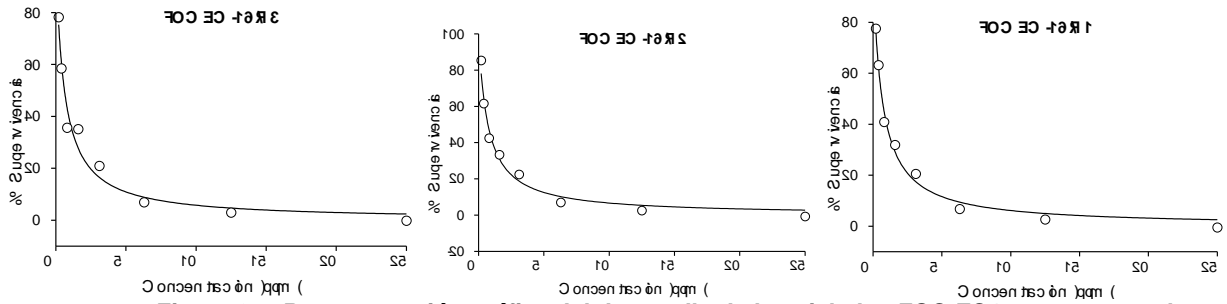


Figura 6.5 Representación gráfica del desarrollo de los aislados FOC.EC15 expuestos a las nanopartículas de plata.

Tabla 6.3 Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio, desviación estándar individual y global.

Concentración Letal Media en ppm (CL50)															
	FOC EC.15			FOC EC.40			FOC EC.35			FOC EC.19			FOC EC.16		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	0,7	0,9	0,7	1,2	1,1	1,1	1,8	1,7	1,8	0,7	0,5	0,7	0,7	0,7	0,6
X	0,78			1,12			1,74			0,65			0,66		
D.S	0,10786			0,33222			0,06557			0,11930			0,05508		
XT	1,05														
D.S.T	0,499974444														

6.2 Resultados del microorganismo patógeno (*Pseudocercospora fijiensis*) con las Ag-NPs

Tabla 6.4 Porcentaje de supervivencia de los cinco aislados de *Pseudocercospora* por triplicad

Concentración (ppm)	MF IS.46			MF IS.45			MF IS.7		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
25	3,50	3,40	3,16	4,86	5,17	5,01	7,24	7,72	7,21
12,5	11,66	11,90	12,44	12,78	15,01	14,08	18,13	19,61	17,25
6,3	20,12	23,92	22,85	23,90	26,78	24,50	27,02	28,17	26,99
3,1	32,11	33,84	28,14	35,59	38,31	36,66	40,97	42,11	40,99
1,6	43,74	46,58	50,37	48,45	49,88	47,84	51,33	53,90	50,21
0,8	57,48	64,04	60,83	66,61	68,76	67,36	64,21	67,44	68,77
0,4	69,08	75,78	73,36	76,55	81,40	81,31	81,18	83,25	80,40
0,2	85,66	88,73	86,85	89,60	91,68	88,33	93,01	89,06	91,70

Concentración (ppm)	MF IS.4			MF IS.15		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
25	6,24	6,07	6,83	5,00	4,78	5,33
12,5	16,77	17,03	16,97	13,55	13,33	14,24
6,3	28,24	27,21	27,84	24,92	23,72	26,84
3,1	39,20	39,18	39,03	36,78	36,15	39,00
1,6	55,88	54,05	51,41	49,92	49,16	51,34
0,8	69,55	68,81	65,40	62,51	60,99	64,51
0,4	84,37	80,83	78,57	77,43	75,81	78,21
0,2	91,99	89,32	89,95	86,25	85,00	86,96

Tabla 6.5 Tabla de promedio, desviación estándar y porcentaje de inhibición de cada aislado

Concentración (ppm)	MF IS.46			MF IS.45			MF IS.7		
	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición
25	3,354	0,173	97	5,014	0,156	95	7,388	0,290	93
12,5	12,000	0,397	88	13,955	1,117	86	18,331	1,192	82
6,3	22,299	1,961	78	25,060	1,518	75	27,393	0,676	73
3,1	31,362	2,924	69	36,853	1,372	63	41,355	0,653	59
1,6	46,896	3,324	53	48,722	1,044	51	51,813	1,895	48
0,8	60,785	3,284	39	67,575	1,092	32	66,807	2,341	33
0,4	72,742	3,390	27	79,753	2,779	20	81,610	1,474	18
0,2	87,08	1,551	13	89,872	1,694	10	91,258	2,016	9

Concentración (ppm)	MF IS.4			MF IS.15		
	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición
25	6,380	0,402	94	5,034	0,275	95
12,5	16,924	0,137	83	13,710	0,475	86
6,3	27,764	0,516	72	25,161	1,575	75
3,1	39,137	0,095	61	37,309	1,498	63
1,6	53,779	2,246	46	50,139	1,106	50
0,8	67,921	2,217	32	62,667	1,765	37
0,4	81,253	2,924	19	77,149	1,220	23
0,2	90,42	1,397	10	86,070	0,991	14

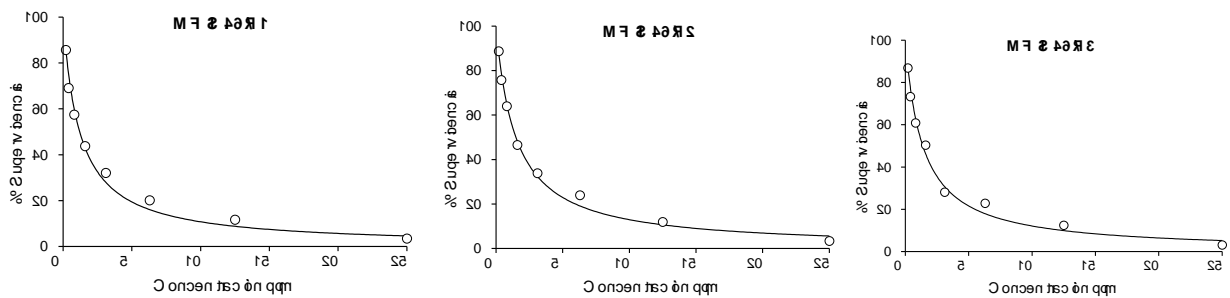


Figura 6.6 Representación gráfica del desarrollo de los aislados IS.46 expuestos a las nanopartículas de plata.

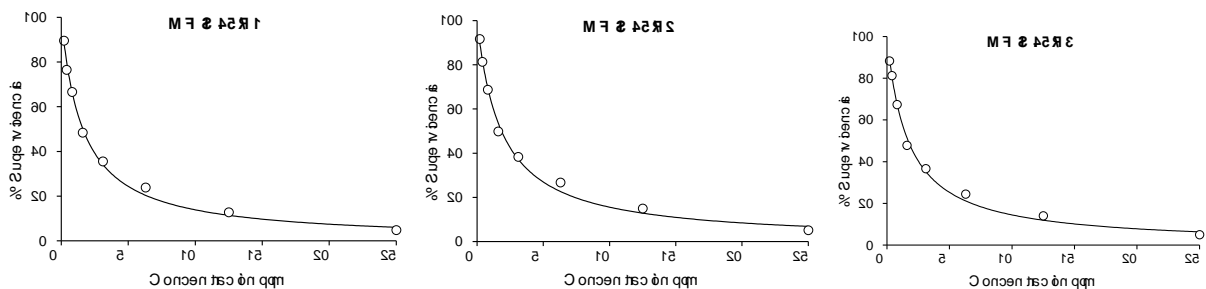


Figura 6.7 Representación gráfica del desarrollo de los aislados IS.45 expuestos a las nanopartículas de plata.

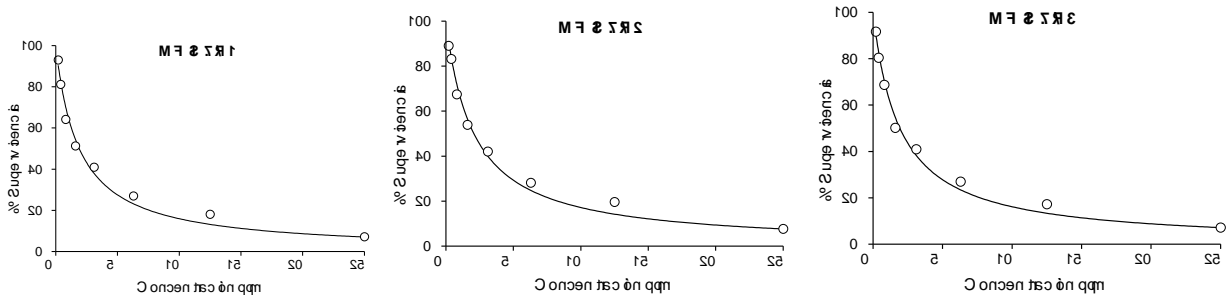


Figura 6.8 Representación gráfica del desarrollo de los aislados IS.7 expuestos a las nanopartículas de plata.

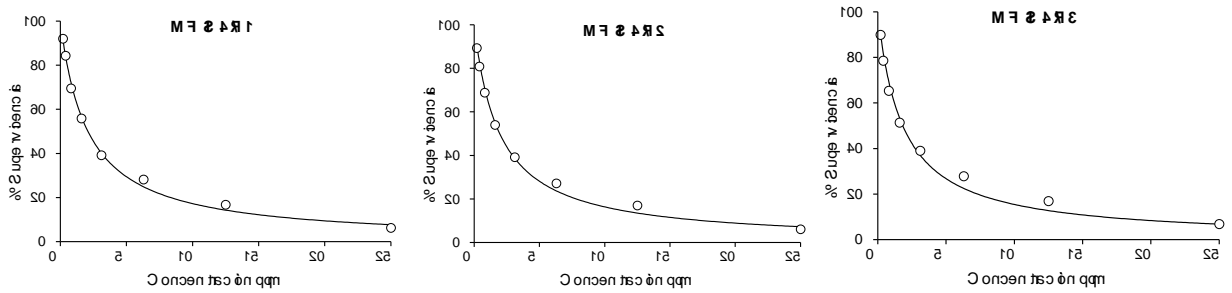


Figura 6.9 Representación gráfica del desarrollo de los aislados IS.4 expuestos a las nanopartículas de plata.

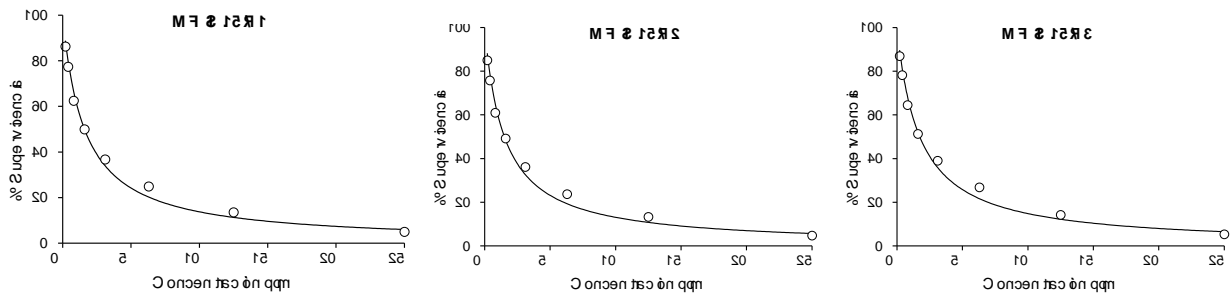


Figura 6.10 Representación gráfica del desarrollo de los aislados IS.15 expuestos a las nanopartículas de plata.

Tabla 6.6 Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio, desviación estándar individual y global

Concentración Letal Media en ppm (CL50)															
	TH. BAM 15			TH. BAM 3			TH. BAM 36			TH. BAM 21			TH. BAM 7		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
X	1,2	1,5	1,4	1,6	1,8	1,7	1,9	2,1	1,9	2,1	2	1,8	1,6	1,5	1,7
D.S	0,14107			0,12124			0,09074			0,12503			0,12124		
Xt	1,72														
D.S.t	0,257084076														

6.3 Resultados del microorganismo patógeno (*Trichoderma* spp) con las Ag-NPs

Tabla 6.7 Porcentaje de supervivencia de los cinco aislados de *Trichoderma* por triplicado

Concentración (ppm)	TH BAM.15			TH BAM.3			TH BAM.36		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
25	11,64	11,31	10,81	18,90	19,87	23,80	16,53	18,37	16,20
12,5	27,61	28,27	25,69	33,34	32,67	35,40	32,44	34,09	33,28
6,3	39,77	39,33	38,13	45,67	43,10	45,25	61,22	54,60	54,05
3,1	59,25	65,78	56,31	64,61	68,19	65,64	66,95	56,56	60,64
1,6	67,49	66,89	66,06	79,70	73,21	76,59	71,09	67,53	70,78
0,8	79,35	79,57	76,36	84,22	83,22	82,29	75,30	87,29	86,05
0,4	89,62	88,84	86,67	93,28	90,44	89,02	87,51	94,98	92,83
0,2	101,13	112,27	104,62	103,42	100,95	99,45	93,72	104,91	100,67

Concentración (ppm)	TH BAM. 21			TH BAM. 7		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
25	18,31	20,32	22,25	16,65	19,33	17,04
12,5	25,48	27,25	26,10	24,83	26,57	24,98
6,3	35,73	37,94	36,70	31,83	33,38	35,42
3,1	56,39	58,74	55,22	56,09	57,20	54,88
1,6	69,50	72,57	71,50	69,78	72,36	68,25
0,8	79,27	82,75	80,01	76,69	79,72	78,52
0,4	91,02	93,65	94,35	87,83	93,34	87,65
0,2	100,06	104,14	110,34	98,66	101,81	102,41

Tabla 6.8 Tabla de promedio, desviación estándar y porcentaje de inhibición de cada aislado

Concentración (ppm)	TH BAM.15			TH BAM.3			TH BAM.36		
	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición
25	11,253	0,421	89	20,859	2,594	79	17,031	1,171	83
12,5	27,191	1,343	73	33,805	1,422	66	33,269	0,826	67
6,3	39,080	0,848	61	44,673	1,375	55	56,622	3,992	43
3,1	60,447	4,847	40	66,147	1,839	34	61,383	5,234	39
1,6	66,813	0,714	33	76,500	3,248	24	69,799	1,968	30
0,8	78,424	1,794	22	83,240	0,964	17	82,878	6,595	17
0,4	88,377	1,525	12	90,917	2,170	9	91,776	3,846	8
0,2	106,01	5,703	0	101,274	2,001	0	99,769	5,648	0

Concentración (ppm)	TH BAM. 21			TH BAM. 7		
	X	Desv. Estándar	% Inhibición	X	Desv. Estándar	% Inhibición
25	20,291	1,969	80	17,673	1,444	82
12,5	26,277	0,899	74	25,456	0,965	75
6,25	36,791	1,108	63	33,541	1,800	66
3,125	56,781	1,793	43	56,057	1,158	44
1,5625	71,191	1,556	29	70,129	2,078	30
0,78125	80,675	1,837	0	78,310	1,529	0

0,4	93,006	1,755	7	89,607	3,234	10
0,2	104,85	5,177	0	100,960	2,018	0

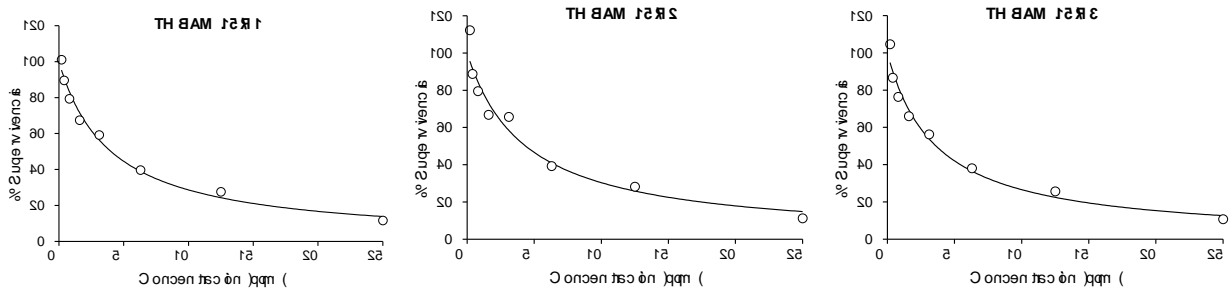


Figura 6.11 Representación gráfica del desarrollo de los aislados BAM.15 expuestos a las nanopartículas de plata.

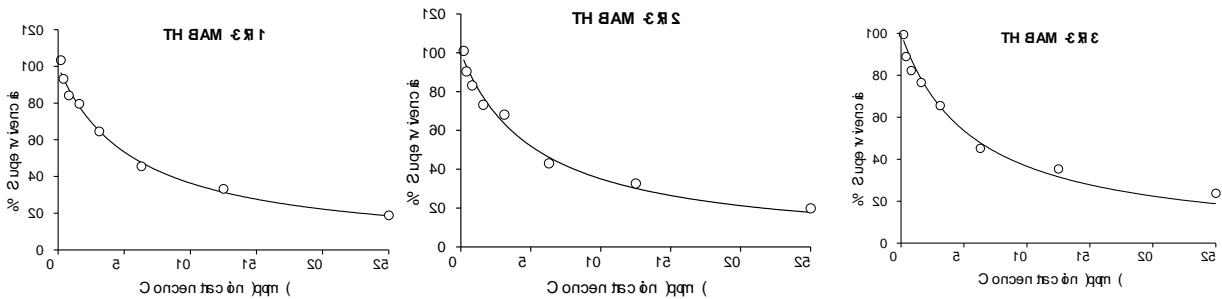


Figura 6.12 Representación gráfica del desarrollo de los aislados BAM.3 expuestos a las nanopartículas de plata.

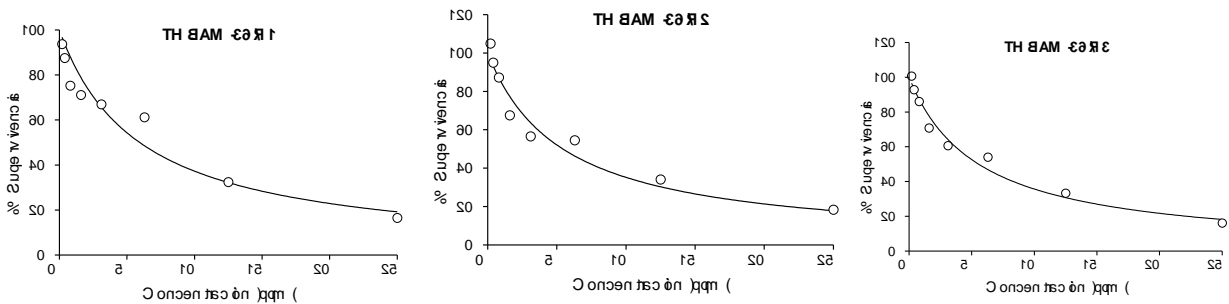


Figura 6.13 Representación gráfica del desarrollo de los aislados BAM.35 expuestos a las nanopartículas de plata.

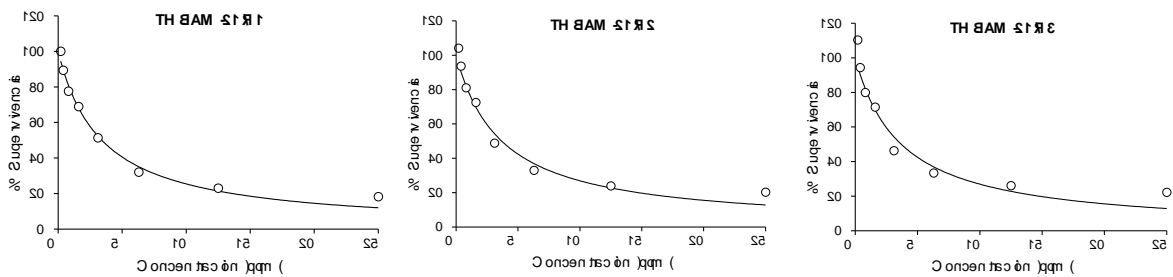


Figura 6.14 Representación gráfica del desarrollo de los aislados BAM.21 expuestos a las nanopartículas de plata.

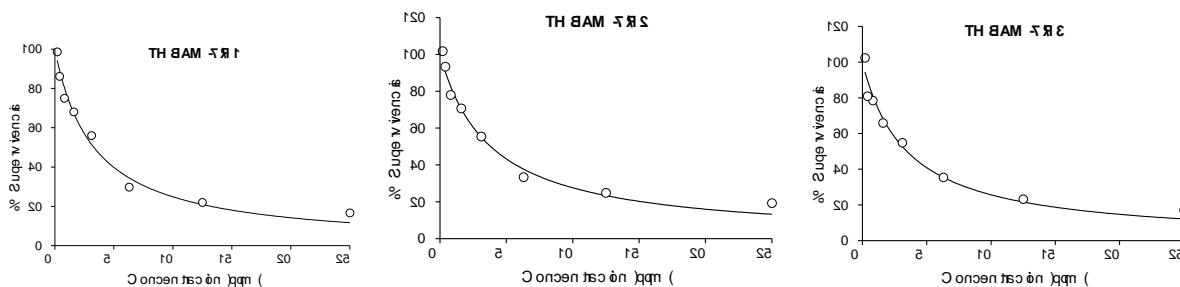


Figura 6.15 Representación gráfica del desarrollo de los aislados BAM.7 expuestos a las nanopartículas de plata.

Tabla 6.9 Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio, desviación estándar individual y global.

Concentración Letal Media en ppm (CL50)															
	TH. BAM 15			TH. BAM 3			TH. BAM 36			TH. BAM 21			TH. BAM 7		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	4,6	4,3	3,6	5,3	5,4	5,6	5,3	5,4	5,5	4,1	4,5	4,2	4,6	4	4,7
X	4,17			5,43			5,40			4,25			4,43		
D.S	0,51740			0,15275			0,10000			0,18175			0,35105		
Xt	4,74														
D.S.t	0,628207326														

6.4 Resultados de los microorganismos con las nanopartículas de óxido de zinc

Tabla 6.10 Porcentaje de supervivencia de los microorganismos por triplicado

Concentración (ppm)	FOC EC.35			MF IS. 7			TH BAM.3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1000	-0,02	-0,13	0,44	3,81	4,07	3,79	8,09	8,29	7,95
500,0	15,72	14,66	17,08	21,10	22,19	21,42	23,26	24,65	23,83
250,0	32,26	35,84	30,35	36,95	34,39	34,79	39,13	41,66	40,00
125,0	56,10	54,60	49,65	57,60	59,43	56,89	59,44	61,87	60,67
62,5	71,59	73,21	71,12	76,21	73,21	76,59	81,64	83,48	82,20
31,3	104,76	101,18	98,29	99,63	100,74	101,73	102,07	103,92	103,66

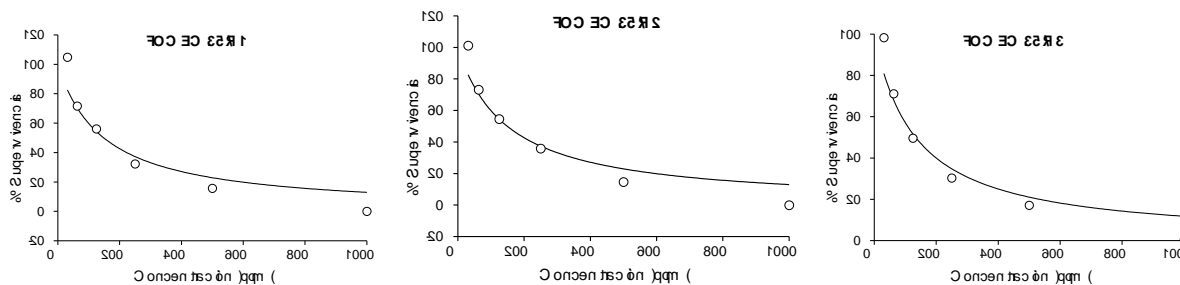


Figura 6.15 Representación gráfica del desarrollo de los aislados FOC.EC.35 expuestos a las nanopartículas de óxido de zinc

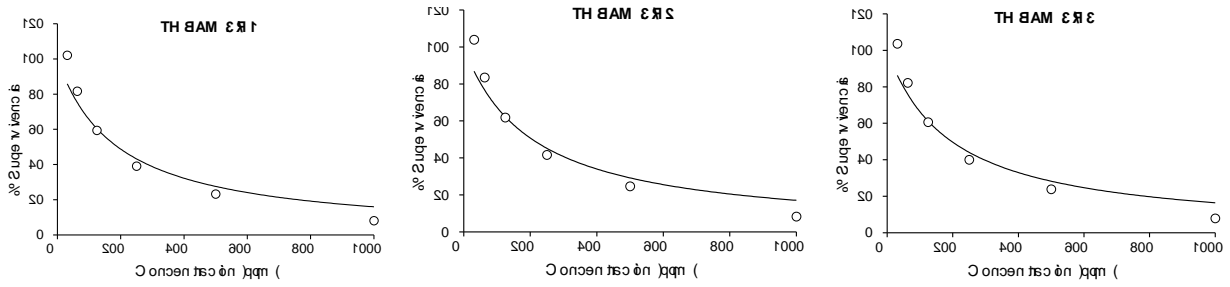


Figura 6.16 Representación gráfica del desarrollo de los aislados BAM.3 expuestos a las nanopartículas de óxido de zinc

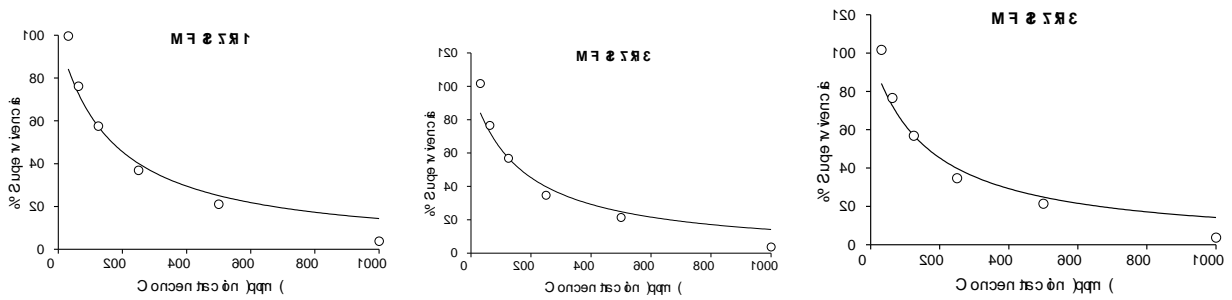


Figura 6.17 Representación gráfica del desarrollo de los aislados IS.7 expuestos a las nanopartículas de óxido de zinc

Tabla 6.11 Resultados de la concentración letal media por cada aislado junto con el promedio, desviación estándar individual y global.

Concentración Letal Media en ppm (CL50)									
	FOC EC.35			MF IS.7			MF IS.7		
	R1	R1	R1	R1	R1	R3	R1	R2	R3
	248	268,7	268,7	268,7	265,6	266,3	290,3	276,3	297,1
X	243,40			266,87			297,87		
D.S	8,75842			1,62583			8,02583		