

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Reporte Técnico de Residencia Profesional

Nombre del Proyecto:

“Efectividad Biológica de Fitonanopartículas de *Justicia spicigera* en Hongos de Importancia Agrícola”

Presenta:

Bernardo Mazariegos Erick Antonio

Asesor Interno:

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli

Asesor Externo:

Dr. Daniel González Mendoza

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Carrera:

Ingeniería Bioquímica

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a Enero de 2018.

Índice

	<i>Pág.</i>
1. Introducción - - - - -	7
2. Marco Teórico - - - - -	8
2.1 <i>Justicia spicigera</i> - - - - -	8
2.1.1 Clasificación - - - - -	9
2.1.2 Distribución Geográfica - - - - -	9
2.1.3 Propiedades Antimicrobianas de <i>J. spicigera</i> - - - - -	10
2.2 Importancia de los Hongos Fitopatógenos - - - - -	10
2.3 Descripción de los Hongos Fitopatógenos - - - - -	10
2.3.1 <i>Macrophomina phaseolina</i> - - - - -	10
2.3.2 <i>Fusarium solani</i> - - - - -	12
2.3.3 <i>Colletotrichum</i> - - - - -	13
2.3.4 <i>Alternaria alternata</i> - - - - -	14
2.3.5 Alternativas de Control de Hongos Fitopatógenos - - - - -	15
2.4 Síntesis de Fitonanopartículas - - - - -	15
2.4.1 Técnicas de Caracterización de las Fitonanopartículas - - - - -	17
2.5 Toxicidad en Plantas - - - - -	19
2.5.1 <i>Prosopis glandulosa</i> - - - - -	20
3. Justificación - - - - -	22
4. Objetivo - - - - -	23
4.1 General - - - - -	23
4.2 Específico - - - - -	23
5. Caracterización del Área de Trabajo - - - - -	24
5.1 Misión - - - - -	24
5.2 Visión - - - - -	24

5.3 Localización - - - - -	24
6. Materiales y Métodos - - - - -	25
6.1 Material Vegetal - - - - -	25
6.2 Preparación de Soluciones Metálicas - - - - -	25
6.3 Preparación de Extracto Acuoso - - - - -	26
6.4 Síntesis Verde de Fitonanopartículas - - - - -	26
6.5 Caracterización de las Fitonanopartículas - - - - -	26
6.6 Evaluación de Actividad Antifúngica - - - - -	27
6.7 Evaluación de Toxicidad en Plantas - - - - -	29
6.8 Análisis de Resultados - - - - -	29
7. Resultados y Discusión - - - - -	30
7.1 Síntesis y Caracterización de Fitonanopartículas - - - - -	30
7.2 Efectividad Biológica de Fitonanopartículas - - - - -	35
7.3 Evaluación de Toxicidad en Plantas de Mezquite - - - - -	41
8. Conclusión - - - - -	46
9. Recomendaciones - - - - -	47
10. Cronograma de Actividades - - - - -	48
11. Anexos - - - - -	49
12. Referencias Bibliográficas - - - - -	59

Índice de Tablas

Tabla.	Descripción	Pág.
1	Tabla taxonómica de la planta tinto (<i>Justicia spicigera</i>).	9
2	Efecto de la radiación electromagnética sobre la materia.	17
3	Espectroscopia e información que puede obtenerse de cada una.	18
4	Características taxonómicas de la planta de Mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>).	20
5	Contenido de compuestos Fenólicos de muestras de Fitonanopartículas y Extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i> .	32
6	Capacidad Antioxidante de Extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i> y Fitonanopartículas, expresado en porcentaje (%).	32
7	Datos de evaluación de toxicidad de Fitonanopartículas de Plata en partes por millón (ppm) en Hojas compuestas de Mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) a los tres días de evaluación del experimento.	42
8	Datos de evaluación de toxicidad de Fitonanopartículas de Cobre en partes por millón (ppm) en Hojas compuestas de Mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) a los tres días de evaluación del experimento.	43
9	Datos de evaluación de toxicidad de Fitonanopartículas de Plata-Cobre en partes por millón (ppm) en Hojas compuestas de Mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>) a los tres días de evaluación del experimento.	44

Índice de Figuras

Fig.	Descripción	Pág.
1	Arbusto de la Planta Tinto (<i>Justicia spicigera</i>).	8
2	Crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Macrophomina</i> / Pudrición y Marchitamiento de planta atacada por <i>M. phaseolina</i> .	11
3	Crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Fusarium solani</i> .	12
4	Crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> / Hoja infectada por <i>Colletotrichum</i> .	13
5	Crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Alternaria</i> .	14
6	Planta de Mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>).	20
7	Material Vegetal (Hojas) seco y triturado uniformemente de <i>J. spicigera</i> .	25
8	a) Placa de Petri con PDA en una de sus mitades; mientras que la otra mitad contiene PDA con NPs al 25% (v/v). b) Unidad Experimental inoculada con el disco que contiene al patógeno.	28
9	Placa de Petri con los tratamientos evaluar y sus unidades Experimentales.	29
10	a) Coloración violeta del extracto; b) Coloración de la síntesis de Nanopartículas de Cobre; c) Coloración de la síntesis de Nanopartículas de Plata-Cobre; d) Coloración de Nanopartículas de Plata.	30
11	Bandas de Absorbancia de Fitonanopartículas y Extracto acuoso obtenidas por espectroscopia UV-Vis en un barrido de 400 a 700 nm.	31
12	Tamaño de las Fitonanopartículas de Plata obtenidas en forma coloidal.	33
13	Tamaño de Fitonanopartículas de Plata obtenidas de los complejos precipitados de la solución coloidal.	33
14	Tamaño de Fitonanopartículas Plata-Cobre obtenida de los complejos precipitados de la solución coloidal.	34
15	Tamaño de las Fitonanopartículas de Plata-Cobre obtenidas en forma coloidal.	34
16	Tamaño de las Fitonanopartículas de Cobre obtenidas en forma coloidal.	35
17	Gráfico de Porcentaje de Inhibición Micelial de NPs de Ag contra el Hongo <i>Macrophomina phaseolina</i> a los 3, 6 y 9 días.	36
18	Gráfico de Porcentaje de Inhibición de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre contra <i>Colletotrichum</i> a los 3, 6 y 9 días.	36
19	Gráfico de Porcentaje de Inhibición de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre contra <i>Fusarium solani</i> a los 3, 6 y 9 días.	37
20	Gráfico de Porcentaje de Inhibición de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre contra <i>Alternaria alternata</i> a los 3, 6 y 9 días.	38
21	Crecimiento micelial de los Hongos Fitopatógenos en Medio PDA (lado izquierdo de la Placa de Petri) y Medio PDA con Fitonanopartículas Plata-Cobre (lado derecho de la Placa de Petri) al 25% (v/v).	39
22	Crecimiento micelial de los Hongos Fitopatógenos en Medio PDA (lado izquierdo de la placa de Petri) y Medio PDA con Fitonanopartículas Cobre (lado derecho de la Placa de Petri) al 25% (v/v).	40
23	Crecimiento micelial de los Hongos Fitopatógenos en Medio PDA (lado izquierdo de la placa de Petri) y Medio PDA con Fitonanopartículas Plata (lado derecho de la Placa de Petri) al 25% (v/v).	41
24	Reacción de las Hojas de Mezquite con las “Soluciones Controles” al tercer y último día del experimento.	45
25	Mecanismo de Acción del Reactivo de Folin-Ciocalteu.	55

26	Estructura de Ácido Gálico.	56
27	Reacciones con el 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).	57
28	Reacción entre el DPPH y la cisteína.	57
29	Descripción de la reacción del radical libre RS•.	58

1. Introducción

Justicia spicigera es una planta nativa de México utilizada desde la época prehistórica para tratar disentería. Sin embargo, los estudios sobre el uso de *Justicia spicigera* para la biosíntesis de Nanopartículas de Plata, Cobre o incluso la combinación Plata-Cobre como un método de química verde son escasos (1).

Los tratamientos químicos y biológicos han sido utilizados con frecuencia para mantener la inocuidad de los alimentos durante la producción, almacenamiento, distribución y preparación de los mismos, esto para asegurar que una vez ingeridos no presenten riesgos para la salud.

Estos tratamientos han hecho que los hongos Fitopatógenos hospedados en el medio ambiente se fortalezcan y vuelvan inmunes a su aplicación, generando grandes pérdidas económicas. Para ello, la síntesis verde de Nanopartículas se muestra como una alternativa para controlar y/o eliminar patógenos que afectan a frutas y hortalizas.

En México el uso de Nanopartículas en el área agropecuaria es reciente y se enfoca en evaluar la aplicación de Nanopartículas obtenidas por síntesis química en la germinación de plantas (2). No obstante, este método de obtención es caro y genera residuos que pueden representar un riesgo a la salud del ecosistema. En este sentido, una alternativa biotecnológicamente viable es la síntesis de Fitonanopartículas a partir de plantas, en donde los compuestos bioactivos presentes en la misma sirven como agentes estabilizantes y reductores de los metales, siendo un procedimiento amigable con el medio ambiente.

Existen pocos reportes en México sobre la obtención de Fitonanopartículas a partir de plantas nativas y su efecto como control de agentes patógenos, específicamente en Hongos patógenos comunes en cultivos de importancia agrícola. De tal forma que en la presente investigación se planteó el evaluar la actividad biológica de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre obtenidas a partir del extracto de la planta *Justicia Spicigera* en Hongos de Importancia agrícola, como son: *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum*.

2. Marco Teórico

2.1 *Justicia spicigera*

Es una especie de planta acuática, originaria de México a Colombia. Es una planta que se encuentra presente en climas cálido, semicálido, semiseco, seco y templado desde el nivel del mar hasta los 3000 m (3).

Esta planta casi siempre se encuentra como arbusto de 1 a 1.5 metros de altura (Figura 1), densamente ramificado. Tiene las hojas más largas que anchas y más o menos peludas con las venas muy marcadas. Las flores se encuentran agrupadas en la unión del tallo y la hoja y en la parte terminal de la planta, comúnmente de color anaranjado, pero algunas veces rojo pálido en forma de tubitos que terminan rasgándose, formándose un labio (3).



Figura 1. Arbusto de la Planta Tinto (*Justicia spicigera*).

Las hojas son de color verde oscuro de 7 cm aproximados de largo. El fruto es mediano, de forma semiesférica y consistencia semileñosa, de 7 a 10 cm de diámetro y semillas pequeñas con sabor semidulce. Las hojas ovadas, de 6.5 cm a 17 cm de largo y de 3.5 cm a 9 cm de ancho, el ápice acuminado, la base atenuada, las hojas secas frecuentemente negro-purpúreas; con pecíolos de 0.5 cm a 1 cm de largo (4).

2.1.1 Clasificación

“*Justicia*” es el nombre genérico otorgado en honor de James Justice (1730-1763), horticultor escocés. Mientras “*spicigera*” proviene del epíteto latino. Esta planta es conocida por distintos nombre como son: Moyotle, Moyotli, Muicle, Trompetilla, Tinto, ych-kaan (idioma maya). En la Tabla 1 se describen las características taxonómicas de la planta (4).

Talaba 1. Tabla taxonómica de la planta tinto (*Justicia spicigera*).

Información Taxonómica	
Reino	<i>Plantae</i>
Sub-reino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Acanthaceae</i>
Sub-familia	<i>Acanthoideae</i>
Tribu	<i>Ruellieae</i>
Sub-tribu	<i>Justiciinae</i>
Género	<i>Justicia</i>
Especie	<i>Justicia spicigera</i>

2.1.2 Distribución Geográfica

Es una planta originaria de México, en el interior de la república se encuentra distribuida en los estados de: Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán. Cultivadas de forma silvestre en Chiapas, Oaxaca y Veracruz (5).

Mientras que en el continente Americano su distribución va desde México hasta Costa Rica; Belice, Colombia, Estados Unidos, Guatemala, Nicaragua, Panamá y El Salvador (5).

Si bien, *Justicia spicigera* es una planta que se da en muchos lugares, crece bien en lugares soleados o con sombra parcial, es mejor en suelos de bajo mantenimiento, en donde se realice debes en cuando una poda moderada para limpiar y darle forma, en tierra pobre no florea bien y no produce muchas hojas, necesita poco riego, en temporada de sequía una cubeta de 10 a 20 litros depende del tamaño de la planta por semana. Su producción se da en forma silvestre, en traspatios y en huertos familiares.

2.1.3 Propiedades antimicrobianas de *J. spicigera*

J. spicigera ha sido objeto de interés científico principalmente por su contenido significativo de compuestos fenólicos que contribuyen a su actividad antioxidante y antidiabética, convirtiendo a esta planta en una alternativa interesante para posibles aplicaciones biotecnológicas (6). Diversos reportes mencionan su uso en la medicina tradicional y farmacología para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y enfermedades como erisipela, sífilis, y gonorrea (4, 7).

En cuanto al uso de *J.spicigera* en el control de bacterias y hongos, estudios realizados por Vega-Avila et al. en 2012 (1), demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y etanólico contra microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Por su parte, Gómez-Verjan et al. en 2012 (8), han evaluado, empujando la técnica de difusión en agar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y etanólico en cultivos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*. En el caso de hongos de importancia fitopatológica, Hernández-Albíter et al. en 2006 (9), demostraron el efecto antifúngico de extractos crudos de *J. spicigera* sobre la germinación de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*. No obstante, estudios sobre la aplicación de esta planta para el diseño de estrategias de biocontrol de hongos Fitopatógenos son necesarios.

2.2 Importancia de los Hongos Fitopatógenos en la Producción Agrícola

Los hongos de importancia agrícola producen pérdidas significativas en los productos alimenticios, en los granos durante su almacenamiento y en los cultivos durante su desarrollo, debido a que éstos afectan a su valor nutritivo por la producción de micotoxinas o bien causan daño directo a la planta afectando el rendimiento del cultivo (10).

En nuestro país, así como en el resto del mundo, esta pérdida en productividad es debida principalmente a hongos Fitopatógenos, tales como *Alternaria*, *Macrophomina*, *Fusarium* y *Colletotrichum* (11). Los principales efectos tóxicos de estos hongos son que causan pudrición radicular afectando el flujo adecuado de nutrientes hacia la parte aérea de la planta, daño en calidad de los frutos por antracnosis causando pérdidas importantes al sector agrícola (12).

2.3 Descripción de los Hongos Fitopatógenos

2.3.1 *Macrophomina phaseolina*

Un hongo polífago que afecta cerca de 500 especies, que se adapta a diferentes condiciones ambientales y con una amplia distribución geográfica gracias a su variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética y a que los esclerocios,

estructuras de resistencia sobreviven en el suelo y son difíciles de destruir (13), lo que favorece el desarrollo bajo condiciones de déficit hídrico y altas temperaturas.

Los síntomas de *M. phaseolina* se pueden confundir fácilmente con otro hongo del suelo *Cannonballus monosporascus* en la producción de melón. Los principales síntomas de *M. phaseolina* incluyen el marchitamiento de la planta (Figura 2), y la pudrición de las raíces similares en apariencia a pudrición de la raíz por *Pythium* con la de desprendimiento de la capa epidérmica. A medida que la planta muere, y el hongo se queda sin nutrientes, las agrupaciones de pequeñas estructuras de negro como espinillas se forman en las raíces. Para *M. phaseolina* es llamado microesclerocios, estos síntomas como granos pequeños en las raíces ayudan a que el hongo sobreviva en el suelo hasta la próxima cosecha que se siembra (14). El microesclerocio de *M. phaseolina* típicamente miden 0.003 pulgadas, 0.007 pulgadas de diámetro. El microesclerocios de *M. phaseolina* puede sobrevivir en el suelo y en los restos de plantas para un máximo de 3 a 12 años. La germinación de la microesclerocios se produce a lo largo de la temporada de crecimiento cuando las temperaturas son entre 28 y 35 ° C (82,4 y 95 ° F).



Figura 2. Crecimiento In vitro de *Macrophomina* / Pudrición y Marchitamiento de planta atacada por *M. phaseolina*.

Sin embargo, *M. phaseolina* es un hongo oportunista que le gusta aprovechar las plantas estresadas. *M. phaseolina* favorece a los suelos con un alto contenido de sal, como en las camas que son compactas o bajo riego por goteo que permiten el drenaje poco para el lavado de la sal durante la temporada de crecimiento (14). Evitar el estrés hídrico y la sal es de suma importancia para la gestión de *M. phaseolina*. Es muy importante controlar la compactación del suelo y el contenido de salinidad, especialmente en sistemas de riego por goteo también se puede producir alta salinidad en suelos que no drenan bien. Lixiviación del suelo para reducir la salinidad, especialmente cerca de la zona de la raíz puede reducir la incidencia de la infección por *M. phaseolina*. El rango de hospederos de *M. phaseolina* es más de 500 especies de plantas, por lo que la rotación a un no-anfitrión de 2-3 años puede ser una opción en algunos sistemas de producción de

cultivos. Si los productores desean evitar la acumulación de patógenos, es fundamental para destruir el tejido de plantas infectadas antes de que el agente patógeno se reproduzca al final de la temporada de crecimiento. En la actualidad, no se conoce de un producto químico antes de la siembra o después que controle el hongo *M. phaseolina*.

2.3.2 *Fusarium solani*

Fusarium es un extenso género de hongo del suelo que habita muchos lugares del mundo. La mayoría de las especies son inofensivos saprofitos relativamente abundantes en la comunidad microbiana del suelo. Sin embargo, algunas especies de *Fusarium* son económicamente significativas debido al devastador impacto que pueden tener en las cosechas.

En un principio, existía algo de confusión acerca de la taxonomía del *Fusarium* y sus más de mil especies, variedades y razas, pero, tan pronto como se hubo consciencia de las enfermedades que puede llegar a causar, la necesidad de un sistema de clasificación preciso se convirtió en algo urgente. Hoy en día, los científicos aun debaten sobre el sistema de clasificación, el cual incluye actualmente entre nueve y cincuenta especies, de cero a veintinueve variedades y de cero a doce formas (15).

Debido a la confusión para identificar muchas de las especies de *Fusarium*, la clasificación también está basada en la sintomatología de la planta. Esto significa que la mayoría de las especies han sido divididas en grupos de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan, tales como *Fusarium* del cáncer del tallo, *Fusarium* de la putrefacción de la raíz y *Fusarium* del marchitamiento vascular.

El grupo del *Fusarium* del cáncer del tallo es un hongo del suelo causado por seis especies: *F. sulphureum*, *F. graminearum*, *F. lateritium*, *F. sambucinum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum*; el de la putrefacción de la raíz es un hongo del suelo causado principalmente por *F. solani*.

Las colonias de *Fusarium* pueden ser pálidas o de colores vivos (dependiendo de la especie), y pueden tener micelio aéreo algodonoso (Figura 3). La variedad de colores comprende el blanquecino, amarillo, amarronado, rosa y rojizo. Las especies de *Fusarium* suelen producir esporas (llamadas macro y microconidios) para reproducirse y diseminarse (15).

Fusarium solani (putrefacción de las raíces) es un hongo saprofito, lo que significa que puede colonizar tejido de la planta que esté muriendo o que ya esté muerto.

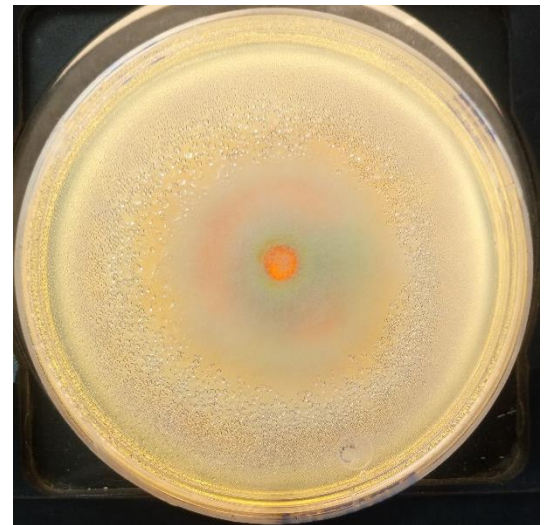


Figura 3. Crecimiento *In vitro* de *Fusarium solani*.

Puede invadir los tallos por los nudos o a nivel del suelo, aprovechándose de cualquier herida existente. Sus esporas germinarán durante periodos prolongados de alta humedad y temperatura.

2.3.3 *Colletotrichum*

Existen muchas enfermedades que atacan a cultivos, siendo uno de mayor importancia económica la antracnosis (*Colletotrichum sp.*), la cual resulta más agresiva en las zonas con humedad relativa alta.

La antracnosis causa una pudrición negra en los frutos y ataca en todas las etapas de su desarrollo, principalmente en los tejidos tiernos. Los frutos se momifican y caen; en el vivero provoca necrosis en el cuello del tallo y en las ramas terminales. Se ha observado que los árboles que crecen en condiciones poco favorables como mal drenaje, plagas, entre otros; son más afectados por la antracnosis, por lo que se recomienda un manejo adecuado de la plantación (16).

Puede desarrollarse sobre numerosas plantas anuales y vivaces. La Antracnosis debida a este hongo es generalmente muy virulenta. Necesita temperaturas elevadas para su desarrollo y propagación. Puede causar daños considerables en clima cálido.

En el corazón de la planta, los síntomas son difíciles de ver pues quedan ocultos por la vegetación. Los botones y brotes quedan pequeños, arqueados y secos, como quemados. Aparecen masas de esporas rosadas y/o anaranjadas, son características de la Antracnosis (17).

Los tallos son afectados por una pudrición negra, que puede proceder de la base del bulbo hasta los sépalos de la flor o del limbo de la hoja (esta última no puede irrigarse y amarillea hasta la necrosis). Posteriormente las fructificaciones rosa anaranjadas aparecen (17).

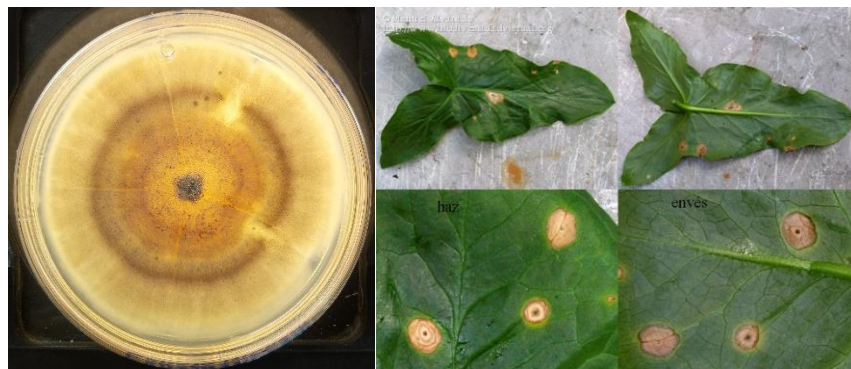


Figura 4. Crecimiento *In vitro* de *Colletotrichum* / Hoja infectada por *Colletotrichum*.

Sobre las hojas, al principio de la infección, aparecen pequeñas manchas redondas y acuosas de color verde claro (Figura 4). Los tejidos se necrosan, las manchas se

secan tomando una tonalidad marrón claro en el centro envuelta por un halo más oscuro donde se localiza el hongo. Las manchas crecen hasta juntarse entre ellas y formar grandes zonas infectadas (17).

El aspecto inicial redondo de las manchas es característico de la Antracnosis, pero no obligatoriamente. Estas pueden tener otras formas desde el inicio de la infección.

En condiciones de calor y humedad extrema, los pétalos pueden ser igualmente afectados. Aparecen manchas idénticas a las de las hojas. La enfermedad se desarrolla esencialmente en condiciones de temperaturas elevadas (25/30°C) (77-86°F) y humedad relativa importante (>80%).

Las esporas se desarrollan sobre zonas húmedas y son diseminadas esencialmente por las salpicaduras del agua de riego o de la lluvia. Los insectos y las manipulaciones pueden también permitir la difusión.

Colletotrichum se propaga muy rápidamente. En 1 o 2 semanas los daños pueden ser considerables.

2.3.4 *Alternaria alternata*

El género *Alternaria* incluye alrededor de 50 especies de hongos ampliamente distribuidas en las regiones templadas de la tierra. Se trata de hongos, generalmente saprófitos o parásitos sobre muchos tipos de plantas hortícolas. Algunas especies pueden descomponer azúcares, pectina y lignina, así como contaminar alimentos con micotoxinas. Las colonias son de crecimiento rápido (tres o cuatro días) y macroscópicamente presentan un aspecto velloso, al principio de color gris, después adquieren tonos negros oliváceos en el centro y reverso y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia (Figura 5).

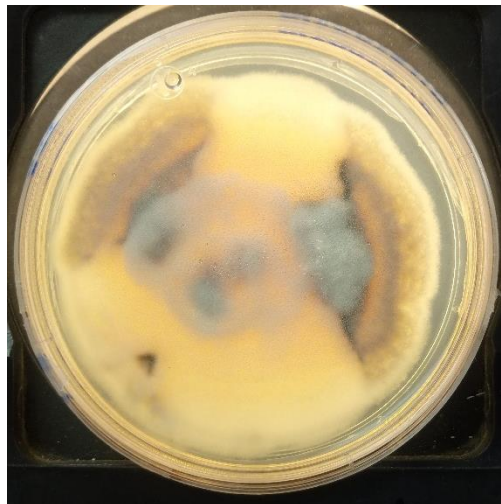


Figura 5. Crecimiento *In vitro* de *Alternaria alternata*.

Los hongos presentes sobre las plantas antes de la cosecha son llamados "hongos del campo" e incluyen especies de los géneros *Alternaria*. Después de la cosecha,

estos hongos pueden mantenerse sobre frutas y hortalizas causando lesiones que alteran su aspecto. También persisten en los granos de cereales almacenados, si están suficientemente secos para impedir el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium* (18).

Alternaria es, después de las especies de *Cladosporium*, el moho cuyos esporos se encuentran suspendidos en el aire con mayor frecuencia. En los cultivos de cereales, las hojas y los granos son colonizados por especies de *Alternaria* y puede haber una penetración sub-epidérmica si toleran las aplicaciones de los fungicidas, por lo que suelen ser aisladas de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha. El género *Alternaria* compite espacialmente con los otros hongos sobre la superficie vegetal y es antagonista de *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium* (18).

La esporulación de *Alternaria* es óptima a 27°C pero es inhibida por debajo de 15°C o por sobre 33°C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35°C. La actividad de agua mínima para el desarrollo es 0,88 y la óptima casi 1,00. El crecimiento se reduce a la mitad en una atmósfera con más de 15% CO₂ o con 2,8% O₂ (18).

Alternaria crece sobre el trigo almacenado si los granos tienen una humedad del 22-23% (19). La infección de tomates por este género es favorecida con la humedad debida a la lluvia o el rocío y una temperatura subóptima (< 15°C), pudiendo causar importantes pérdidas de los frutos.

2.3.5 Alternativas de Control de Hongos Fitopatógenos

Varios estudios han reportado el uso de diferentes alternativas para el control de las enfermedades causadas por los hongos antes mencionados en plantas, estas medidas incluyen la aplicación de control químico (20). Los fungicidas sintéticos son el método más empleado para el control de estos hongos Fitopatógenos. Sin embargo, estos productos han provocado el desarrollo de mecanismos de resistencia en los hongos, a la vez que generan residuos tóxicos en alimentos y en el medio ambiente, poniendo en riesgo la salud del hombre (21). Una alternativa económica y eficiente para el control de enfermedades de las plantas es el uso de productos naturales derivados de plantas, tales como extractos acuosos, etanólicos, acetónicos y aceites esenciales (22). En este sentido el uso de la nanotecnología verde tiene gran importancia debido a la presencia de acción inhibidora contra diferentes especies de hongos (23). Además, de ser un producto amigables con el ambiente, debido a que sus residuos son fáciles de degradar, se pueden utilizar en el control de patógenos de productos agrícolas en pre y poscosecha.

2.4 Síntesis Verde de Fitonanopartículas

El National Institute of Health (NIH) de los Estados Unidos de América define la nanotecnología como la creación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia a escala de 1 a 100 nanómetros y la explotación de propiedades novedosas y fenómenos a esa misma escala (24). En los últimos

años, el uso de plantas como fuente de compuestos bioactivos para la reducción de nanopartículas de diferentes metales ha llamado la atención, debido a la eliminación de reactivos dañinos y la síntesis efectiva de los productos esperados a través de un método económico (25).

Las nanopartículas de metales o de compuestos basados en metales muestran interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas, catalíticas que en general se relacionan con el tamaño y la forma de los nuevos materiales y pueden ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica. Así, las propiedades únicas que muestran las nanopartículas metálicas provienen de la alta relación superficie-volumen (26).

Las propiedades ópticas de las nanopartículas de los metales nobles se basan en la oscilación colectiva de electrones de conducción libre como resultado de su interacción con la radiación. El campo eléctrico de la radiación electromagnética induce la formación de un dipolo en la Nanopartícula creándose una fuerza restauradora en la Nanopartícula creándose una fuerza restauradora en la Nanopartícula que intenta compensar ese efecto, resultando en una longitud de onda de resonancia que le confiere el color característico a las disoluciones coloidales de nanopartículas sintetizadas a partir de metales nobles (27).

En general, la síntesis de Fitonanopartículas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes:

- Precursor metálico (Ag, Cu)
- Agente reductor (compuestos bioactivos presentes en extracto acuoso de la planta)
- Agente estabilizante (compuestos bioactivos presentes en extracto acuoso de la planta)

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de los iones metálicos consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controlados a través de la modificación de los parámetros de reacción (Concentración, temperatura, poder reductor, etc.) (28).

El interés sobre las especies químicas de tamaño nanométrico es una de las áreas de trabajo más importantes de la investigación en química debido, fundamentalmente, a la gran variedad de nuevas propiedades y potenciales aplicaciones que se explotarán en diversos campos (26).

El procedimiento de su obtención se puede aplicar a cualquier clase de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Asimismo, se puede aplicar a

mezclas de diferentes plantas. Se puede someter toda la planta al procedimiento de reducción, aunque se prefieren las hojas y las flores.

2.4.1 Técnicas de Caracterización de las Fitonanopartículas

Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia describe la interacción entre la radiación, principalmente la electromagnética, y la materia. Toda radiación electromagnética viene caracterizada por una longitud de onda (λ), una frecuencia (ν) o una energía (E); la relación existente entre ellas está dada por la ecuación de Planck (29).

El instrumento usado en la espectrofotometría ultravioleta-visible se denomina espectrofotómetro UV-Vis, y permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto con una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia (29).

La radiación electromagnética ocasiona distintos efectos sobre la materia, tal como se indica en la tabla 2:

Tabla 2. Efecto de la radiación electromagnética sobre la materia.

Radiación	Efecto
Rayos X y Cósmicos	Ionizaciones de las Moléculas.
UV-Visible	Transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y moleculares.
Infrarrojo	Deformación de los enlaces químicos.
Microondas	Rotaciones de los enlaces químicos.
Radiofrecuencias	Transiciones de espín electrónico o nuclear en los átomos de la molécula.

Cuando la radiación incide sobre una sustancia, sólo un átomo o conjunto de átomos son capaces de absorber la radiación; estos grupos se denominan Cromóforos y serán distintos dentro de una misma molécula para cada técnica espectroscópica (29).

Los efectos de la radiación sobre la materia pueden usarse para obtener información sobre la estructura de la misma, y así surgen distintas técnicas espectroscópicas, tal como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Espectroscopia e información que puede obtenerse de cada una.

Técnica espectroscópica	Información obtenida
Rayos X	Estructura total de la molécula incluida la estereoquímica.
UV-Visible	Existencia de Cromóforos y/o conjugación en la molécula.
Infrarrojo	Grupos funcionales a partir de las absorciones observadas.
Espectrometría de masas	Formula molecular y subestructuras a partir de los iones observados.
Resonancia nuclear magnética	Grupos funcionales, subestructuras, conectividades, estereoquímica, etc.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra (30).

Además, el microscopio posee diversos sistemas que permiten observar las señales eléctricas procedentes de los detectores, en forma de imágenes en un monitor de TV, fotografía, espectro de elementos, etc.

Por último, en el gráfico se han dibujado dos detectores. Uno, el de electrones secundarios, que son los electrones arrancados a la propia muestra por la acción del haz incidente. Con esta señal obtenemos en un monitor una imagen de la muestra, muy parecida a la visión del ojo humano debido a la gran profundidad de foco de esta señal. El otro detector, de rayos X, captura este tipo de señal, con la que obtenemos un espectro de elementos, es decir un análisis químico elemental de la muestra (30).

La técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra.

La señal de electrones secundarios proporciona una imagen de la morfología superficial de la muestra. La señal de retrodispersados una imagen cualitativa de zonas con distinto número atómico medio, y la señal de rayos X espectros e imágenes acerca de la composición de elementos químicos en la muestra (30).

2.5 Toxicidad en Plantas

En la Tierra existe casi un centenar de elementos químicos naturales, pero los seres vivos que la habitan usan tan solo una veintena. Conforman este grupo numerosos metales, muchos de ellos esenciales para que los organismos puedan completar su ciclo de vida. Sin embargo, mientras algunos son imprescindibles para la supervivencia, el exceso o la presencia de otros pueden resultar tóxicos o aun letales (31).

Las plantas en su metabolismo celular producen sustancias químicas, éstas pueden ser aceites esenciales, sustancias amargas (iridoideas y sesquiterpenlactonas), principios picantes, alcaloides, resinas, taninos, glicósidos (cardiotónicos, antraquinónicos y flavonólicos). Estas sustancias se han ido acumulando como parte del metabolismo secundario, y son los responsables en primer lugar del desarrollo del vegetal y el ser humano los ha utilizado como sustancia curativas a lo largo de su evolución (31).

Las plantas obtienen el carbono, el hidrógeno y el oxígeno principalmente del agua y del dióxido de carbono mientras que el resto de los elementos nutritivos esenciales los incorporan a partir de sales minerales.

Dentro de los elementos esenciales, los metales han cumplido un papel importante en el curso de la evolución por sus propiedades químicas, como la de intervenir en reacciones químicas de transferencia de electrones (reacciones de óxido-reducción) dentro de las células, por ejemplo el cobre y el hierro, o la posibilidad de formar, con otras moléculas, compuestos que intervienen en diversos procesos fisiológicos de los organismos, entre otras. Pero estas mismas propiedades químicas que vuelven a los metales indispensables para la vida los pueden transformar en tóxicos cuando se encuentran en exceso, y el límite entre uno y otro caso es una brecha muy delgada. Además, el resto de los metales presentes en la superficie terrestre que no cumplen funciones biológicas en las plantas, como el cadmio, el mercurio o el plomo, entre otros, son potencialmente tóxicos, aun cuando se encuentran en concentraciones pequeñas (32).

La disminución del crecimiento y el amarillamiento de las hojas (clorosis) son los síntomas más visibles en las plantas que crecen en suelos con alta concentración de metales. Frecuentemente la toxicidad es provocada por la similitud de los metales con otros elementos esenciales, que los reemplazan en sus funciones. Interfieren con diversas moléculas (especialmente de proteínas, lípidos y nucleótidos) bloqueando sus grupos funcionales, modificando su conformación o simplemente alterando su integridad. Entre las causas involucradas en la toxicidad por metales se destaca el estrés oxidativo que ocurre como consecuencia del desbalance entre la generación de especies activas del oxígeno que surgen durante su transformación en agua (reducción) y la capacidad de la célula de evitar su acumulación. Esta reducción parcial de una molécula de oxígeno conlleva la

generación de especies activas como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot), que se caracterizan por poseer un alto poder oxidante capaz de dañar moléculas esenciales para la vida como las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos. Los metales pueden conducir al incremento de los niveles de especies activas del oxígeno a través de diferentes mecanismos (33).

2.5.1 *Prosopis glandulosa*

El mezquite dulce (*Prosopis glandulosa*) es una especie de árbol de la familia de las leguminosas y originaria de Norteamérica (Figura 6).



Figura 6. Planta de Mezquite (*Prosopis glandulosa*).

Es un árbol mediano a pequeño, con corona redondeada y en cayado, ramas pendientes con follaje ligero, y pares de espinas rectas en ramitas. Normalmente alcanza de 5 a 9 m de altura, pero puede llegar a medir 14 m. Florece de marzo a noviembre, con espigas pálidas, amarillas y elongadas, y frutos en vainas amarillas, comestibles por muchas especies animales salvajes. La velocidad de crecimiento de este mezquite es mediana (34).

En la Tabla 4 se muestran las características taxonómicas de esta especie de planta nativa del Norte de México (34).

Tabla 4. Características taxonómicas de la planta de Mezquite (*Prosopis glandulosa*).

Información Taxonómica	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>

Sub-clase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Sub-familia	<i>Mimosoideae</i>
Tribu	<i>Mimoseae</i>
Género	<i>Prosopis</i>
Especie	<i>Prosopis glandulosa</i>

3. Justificación

En la actualidad cuando se trata de combatir a hongos Fitopatógenos de importancia agrícola se hablan de Métodos Químicos y Biológicos.

El primero de estos, los tratamientos Químicos han resultado muy efectivo pero han traído consigo contaminación al medio ambiente, toxicidad en seres humanos y toxicidad para la misma naturaleza (35); a largo plazo han provocado resistencia en patógenos, llevando de forma paralela a emplear mayores dosis para obtener resultados eficientes.

Por otro lado, los tratamientos Biológicos son de bajo costo de producción, los inóculos empleados son amigables con el ambiente, pero se debe considerar que la efectividad de este tratamiento depende del ambiente, esto, es debido a que los inóculos son organismos vivos aislados en zonas geográficas diferentes de donde serán empleadas lo que ha resultado en la mayoría de los casos en una baja efectividad (36).

Es por ello, que la Síntesis verde de Fitonanopartículas a partir de extracto acuoso de *Justicia spicigera* podría representar una alternativa biotecnológicamente viable para el control de hongos Fitopatógenos. Ya que dentro de sus múltiples ventajas se puede hacer referencia su bajo costo de producción, amigable con el medio ambiente y en comparación con los tratamientos biológicos su efectividad no depende de una zona geográfica en específico, lo que le brinda una alta efectividad.

4. Objetivo

4.1 General

Obtención de Fitonanopartículas a partir del extracto acuoso de *Justicia spicigera* es una alternativa Biotecnológicamente viable para el biocontrol de hongos Fitopatógenos de importancia agrícola bajo condiciones *in vitro*.

4.2 Específicos

1. Implementar la metodología para la síntesis verde de Fitonanopartículas a partir del extracto acuoso de *Justicia spicigera*.
2. Caracterizar Física y Químicamente las Fitonanopartículas de Plata, Cobre, Plata-Cobre de *Justicia spicigera*.
3. Evaluar actividad Antifúngica en *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum sp.* bajo condiciones *in vitro*.
4. Evaluar la biotoxicidad de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre por medio de Bioensayos de discos foliares en Mezquite (*Prosopis glandulosa*).
5. Analizar resultados en cuadros y gráficos estadísticos.

5. Caracterización del Área de Trabajo

5.1 Misión

Formar íntegramente ciudadanos profesionales, competentes en el ámbito local, nacional, transfronterizo e internacional, libres, críticos, creativos, solidarios, emprendedores, con una visión global, conscientes de su participación en el desarrollo sustentable global y capaces de transformar su entorno con responsabilidad y compromiso ético; así como promover, generar, aplicar, difundir y transferir el conocimiento para contribuir al desarrollo sustentable, al avance de la ciencia, la tecnología, las humanidades, el arte y la innovación, y al incremento del nivel de desarrollo humano de la sociedad bajacaliforniana y del país.

5.2 Visión

En 2025, la UABC es ampliamente reconocida por ser una institución socialmente responsable que contribuye, con oportunidad, pertinencia y los mejores estándares de calidad, a incrementar el nivel de desarrollo humano de la sociedad bajacaliforniana y del país; así como por ser una de las cinco mejores instituciones de educación superior en México y de las primeras 50 en Latinoamérica en la formación universitaria, la generación, aplicación innovadora y transferencia de conocimiento, y en la promoción de la ciencia, la cultura y el arte.

5.3 Localización

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Carretera a Delta s/n C.P. 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México.

6. Materiales y Métodos

6.1 Material Vegetal

Las hojas de la planta “Tinto” (*Justicia spicigera*) como comúnmente se le conoce, fueron utilizadas para la obtención de extracto acuoso. Estas fueron secadas a luz solar por una semana, siendo posteriormente trituradas a un tamaño uniforme para futuros experimentos, tal como se ilustra en la Figura 7.



Figura 7. Material Vegetal (Hojas) seco y triturado uniformemente de *J. spicigera*.

6.2 Preparación de Soluciones Metálicas

Nitrato de Plata (AgNO_3)

Para preparar una solución de nitrato de plata a base 100 a una concentración de 10 mM (37), se pesó 0.16987 g de Nitrato de plata, esto fue colocado en un matraz volumétrico de 100 mL en donde se aforó al volumen determinado.

Nitrato Cúprico ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

Para preparar una solución de nitrato cúprico a una concentración de 10 mM (37) a base 100, se pesó 0.2416 g de Nitrato Cúprico, esto fue colocado en un matraz volumétrico de 100 mL en donde se aforó al volumen determinado.

6.3 Preparación de Extracto Acuoso

Del material vegetal obtenido se prosiguió con la preparación de extracto acuoso, la relación empleada es 1:10 (p/v).

La solución obtenida es calentada por 30 min a 60°C en una placa de calentamiento con agitación constante. Transcurrido el tiempo, se realizó una centrifugación a 4000 rpm por 25 min, esto con la finalidad de separar el material vegetal presente en la muestra. Después con ayuda de una gaza fue necesario filtrar el extracto, lo que permitió retirar el material vegetal presente en el extracto.

Para finalizar el proceso, se realizó una filtración con ayuda de filtros de jeringa de 0.22 μm en condiciones estériles. El extracto fue colocado en refrigeración en tubos eppendorf de 50 mL.

6.4 Síntesis Verde de Fitonanopartículas

En la síntesis de Fitonanopartículas se empleó una relación 1:4 (v/v), es decir, 1 unidad de extracto acuoso (agente reductor y agente estabilizante) en 4 unidades de la solución metálica de interés (Nitrato de Plata, Nitrato Cúprico y la combinación Nitrato Cúprico-Nitrato de Plata) a una concentración de 10 mM, las cuales sirven como precursoras de la síntesis.

Estas soluciones fueron calentadas en baño maría por 15 min a 60°C.

6.5 Caracterización de las Fitonanopartículas

Espectroscopia UV - Visible

Espectroscopia UV-Visible (Anexo 1) se utilizó para detectar y confirmar la presencia de varios iones en una muestra dada sobre la base de sus picos de absorbancia óptica. A medida que el tamaño de las nanopartículas disminuye, aumenta la banda prohibida y por lo tanto los aumentos ópticos de absorbancia en comparación con la de las partículas a granel y por lo tanto sus cambios de color (38).

Para estudiar el comportamiento de las muestras de interés se diluyeron con agua destilada (100 μL de la muestra en 900 μL de agua destilada), siendo las muestras analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific BioMate 3 Espectrofotómetro, EE.UU.) en un barrido de 400 a 700 nm. Utilizando como blanco 100 μL de Nitrato de plata en 900 μL de Agua destilada, esto para leer muestra 1 (NPs Ag + Agua); 100 μL de Nitrato cúprico en 900 μL de Agua destilada para leer muestra 2 (NPs Cu + Agua); 100 μL de Nitrato de plata-Nitrato cúprico (1:1) en 900

μL de Agua destilada para realizar lectura de muestra 3 (NPs Ag-Cu + Agua); para lectura de extracto acuoso de *J. spicigera* se utilizó como blanco agua destilada.

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis de Dispersión de Espectroscopia de Rayos X (EDS)

La evaluación de tamaño y morfológica de las NPs Ag, NPs Cu, NPs Ag-Cu se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM) JOEL 6010 a una tensión de aceleración de 10 kV. Se prepararon películas delgadas de la muestra en una rejilla de cobre revestida con carbono simplemente dejando caer una cantidad muy pequeña de la muestra en la rejilla, se extrajo la solución extra usando un papel secante y luego se dejó secar la película en la rejilla SEM colocándola debajo de una lámpara de mercurio durante 5 min.

Para el análisis de EDS, las NPs de la muestra de interés se secaron y se cubrieron con una película de carbono. El análisis EDS se realizó luego usando el instrumento Oxford Thermo EDS (39).

Los análisis EDS y SEM fueron realizados por el Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, calle de la Normal s/n y Boulevard Benito Juárez, C.P. 21100, Mexicali, México.

Mediciones de potencial Zeta y Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Los potenciales zeta de superficie se midieron usando el zetameter láser (C: \ Microtrac \ FLEX 11.0.0.4 \ Databases \ NANOPARTICULAS. MDB). El tamaño medio y su potencial zeta de las partículas presente en la muestra. La dispersión de luz dinámica (o espectroscopia de correlación de fotones) es una técnica importante generalmente utilizada para realizar el patrón de distribución de tamaño de partículas muy pequeñas presentes en suspensión o solución. Las mediciones se realizaron por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) en el rango de 0.1-1000 μm (40).

El análisis DLS fue realizado por el Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, calle de la Normal s/n y Boulevard Benito Juárez, C.P. 21100, Mexicali, México.

6.6 Evaluación de Actividad Antifúngica

En la evaluación de actividad biológica de las nanopartículas en hongos de importancia agrícola se utilizó el método de confrontación dual con algunas modificaciones (41).

Fueron necesarias placas de Petri de 90 x 15 mm con división, colocando en la primera mitad medio PDA como control de experimento, en la mitad restante se colocó medio PDA con las NPs de interés a evaluar (Plata, Cobre, Plata-Cobre) a una proporción del 25 % (v/v); Figura 8 – a). Luego de mantener las placas en

prueba de esterilidad por 24 hrs, se prosiguió con la inoculación de los discos de patógenos.

Los stock (placas de Petri con medio PDA) que contenían el patógeno de interés; *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum* fueron proporcionados por el cepario del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC. De estos se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro los cuales fueron inoculados en cada extremo de cada una de las unidades experimentales, es decir, un disco en el control (PDA) y un disco más en el tratamiento a evaluar (PDA con NPs 25% (v/v)); Figura 8 – b).

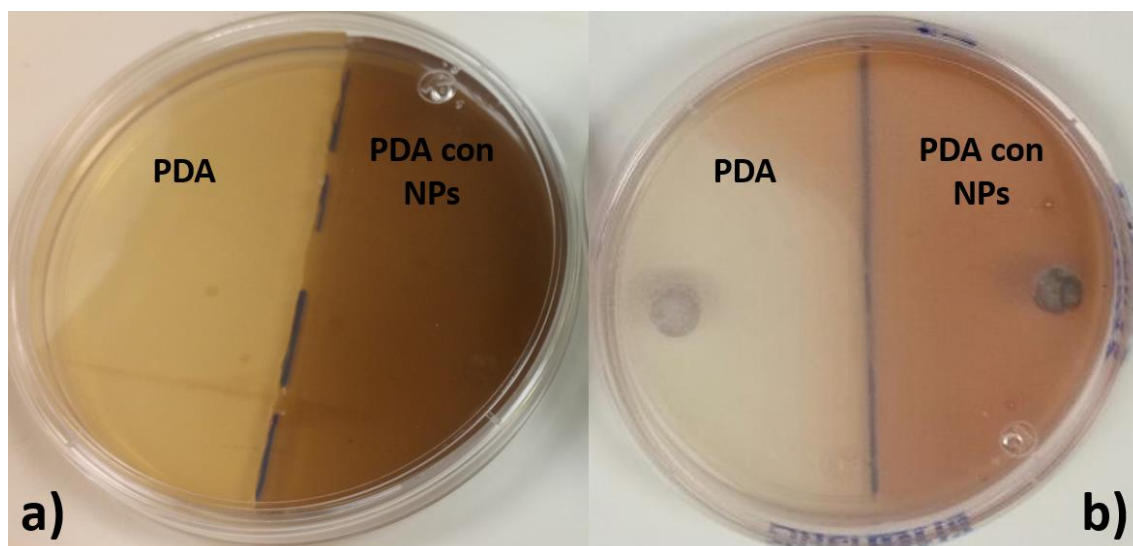


Figura 8. a) Placa de Petri con PDA en una de sus mitades; mientras que la otra mitad contiene PDA con NPs al 25% (v/v). b) Unidad Experimental inoculada con el disco que contiene al patógeno.

Las unidades experimentales fueron colocadas en una incubadora a 30°C, teniendo 5 repeticiones por tratamiento, las cuales se evaluaron por 9 días tomando datos de crecimiento micelial cada tercer día. Los resultados fueron expresados en Porcentaje de Inhibición Micelial (PIM) por medio de la siguiente ecuación (42):

$$PIM = \left(\frac{dc - dt}{dc} \right) * 100$$

Donde:

dc= diámetro de la colonia del control.

dt= diámetro de la colonia del tratamiento.

6.7 Evaluación de Toxicidad en Plantas

Hojas compuestas del árbol de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) fueron utilizadas para la formación de discos foliares (43) y evaluar la toxicidad de las nanopartículas.

Teniendo como controles agua, extracto acuoso de *J. spicigera*, Nitrato de Plata, Nitrato de Cúprico y la combinación de ambas soluciones. Los tratamientos fueron NPs de Plata, NPs de Cobre, NPs Plata-Cobre a concentraciones de 100, 75, 50, 25, 10, 1 ppm.



Figura 9. Placa de Petri con los tratamientos evaluar y sus unidades Experimentales.

Por cada tratamiento se realizaron dos repeticiones con tres unidades experimentales, las cuales estaban contenidas en placas de Petri de 60 x 15 mm con 10 mL de la muestra, como se muestra en la Figura 9.

Las muestras se monitorearon por 3 días, considerando los siguientes parámetros: Antocianinas, Flavonoides, Nivel de contenido de Nitrógeno (NBI), Clorofila con el equipo Dualex Scientific+™ (Anexo 2), y Nivel de Fluorescencia (Fv/m, Fo, Fm) utilizando como equipo un Fluorometro Opti-Sciences (Anexo 3), ambos basados en métodos no destructivos.

6.8 Análisis de Resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados con ayuda del software Sigma Plot 12.0 para la obtención de Gráficas de Barra (% de Inhibición) y Graficas Lineales (Barrido de Absorbancias).

7. Resultados y Discusión

7.1 Síntesis y Caracterización de Fitonanopartículas

La confirmación preliminar de la formación de Fitonanopartículas fue el cambio de coloración de las muestras al momento de ser introducidas al tratamiento térmico por un tiempo determinado (15 minutos); ya que de un color violeta (extracto con solución de nitrato de interés) hubo un cambio de color característico para cada síntesis de Fitonanopartículas; en el caso de síntesis de Fitonanopartículas utilizando nitrato de plata como precursor, la coloración de la solución se tornó en un tono rojo violáceo; mientras que al utilizar nitrato cúprico como precursor, la coloración fue de violeta a un café claro; por otro lado, al utilizar la combinación de nitrato cúprico-nitrato plata como precursores la coloración inicial se tornó café oscuro, es pertinente mencionar que cada una de las muestras presentó precipitaciones (complejos) tal como se muestra en la Figura 10.

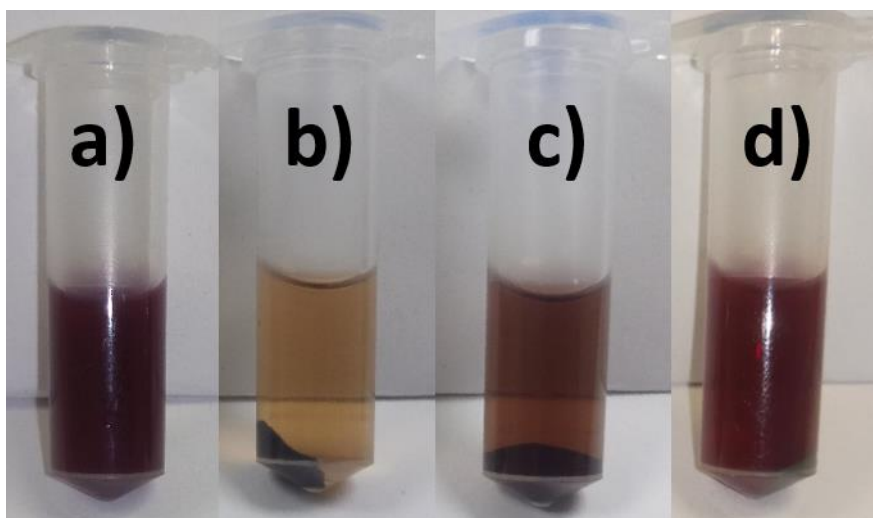


Figura 10. a) Coloración violeta del extracto; b) Coloración de la síntesis de Nanopartículas de Cobre; c) Coloración de la síntesis de Nanopartículas de Plata-Cobre; d) Coloración de Nanopartículas de Plata.

El cambio de coloración de las soluciones coloidales puede deberse a la excitación creada por la resonancia del plasmón superficial y por la reducción del metal, en este sentido, el extracto acuoso de *J. spicigera* es rico en flavonoides, fenoles, taninos y aceite esencial (44), estos, podrían actuar como agente reductor de las soluciones de nitrato (plata, cobre, plata-cobre), lo que le brinda estabilidad a los complejos formados en la síntesis.

En paralelo, el análisis de espectroscopia UV-Vis de las Nanopartículas mostró una banda de absorción característica, en el caso de las NPs Ag el pico se aprecia a 480 nm, en NPs Cu se observa a una longitud de onda de 470 nm, mientras que en las NPs Ag-Cu el pico se observa a 520nm; esto en comparación a la banda de

absorción obtenida con el extracto acuoso de la planta, la que muestra un comportamiento diferente al descrito con anterioridad (Figura 11).

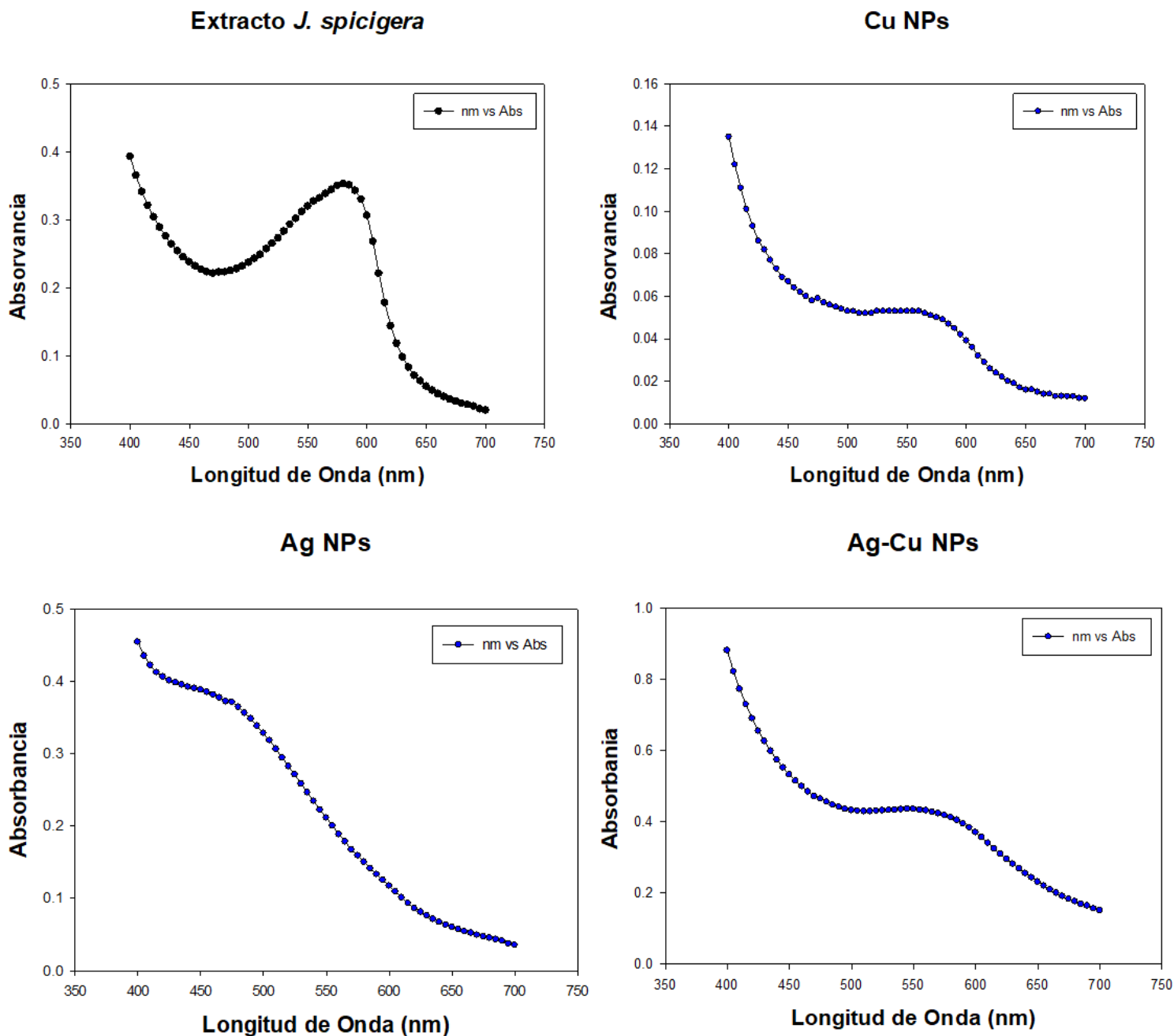


Figura 11. Bandas de Absorbancia de Fitonanopartículas y Extracto acuoso obtenidas por espectroscopia UV-Vis en un barrido de 400 a 700 nm.

Esto se confirmó con informes anteriores en donde Nanopartículas monometálicas de Oro muestran un pico característico en un rango de 400-500 nm, mientras que

para Nanopartículas bimetálicas de Oro-Plata el rango aumenta de 500-600 nm (45).

Además, la técnica de fenoles totales (Anexo 4) demostró la capacidad reductora presente en las muestras, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos de muestras de Fitonanopartículas y Extracto acuoso de *Justicia spicigera*.

Fenoles Totales	
Muestra	mg de Ác. Gálico/mL
<i>J. spicigera</i>	71.4927 ± 0.5759
NPs Ag	163.1343 ± 2.0549
NPs Cu	219.2538 ± 2.9459
NPs Ag-Cu	108.696 ± 14.6217

Para el análisis de estos resultados y como se observa en la tabla 5; el extracto acuoso de *J. spicigera* muestra una concentración de fenoles totales menor a los obtenidos en las muestras de Fitonanopartículas, pudiendo atribuir estos resultados a que al ser una técnica colorimétrica, la técnica espectrofotométrica cuantificó aquellos metabolitos que se encontraban suspendidas en la muestra como también aquellas que se encontraban reaccionando con el complejo metálico para estabilizarla.

Mientras que la Capacidad Antioxidante (Anexo 5) reafirmó los resultados obtenidos en la tabla 5; esto debido a que en el extracto acuoso de *J. spicigera* los metabolitos se encontraban en mayor cantidad suspendidos en la solución y sin reaccionar, lo que le permitió a este alto número de metabolitos reaccionar con facilidad y reducir al DPPH, resultando en un porcentaje de capacidad antioxidante elevado, esto en comparación con los obtenidos en las muestras con nanopartículas, en donde la mayor cantidad de metabolitos (fenoles) estaba reaccionando con el complejo metálico, brindándole estabilidad a la molécula lo que propició un bajo porcentaje de capacidad antioxidante, siendo que los metabolitos aun sin reaccionar presentes en la muestra con nanopartículas las encargadas de reducir al DPPH, resultados que se aprecian en la Tabla 6.

Tabla 6. Capacidad Antioxidante de Extracto acuoso de *Justicia spicigera* y Fitonanopartículas, expresado en porcentaje (%).

Capacidad Antioxidante	
Muestra	%
<i>J. spicigera</i>	38.3135 ± 1.5597
NPs Ag	36.6440 ± 4.1415
NPs Cu	3.4805 ± 14.6994
NPs Ag-Cu	16.0441 ± 6.8095

El análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) de las Fitonanopartículas en forma coloidal, indicaron la formación de dos picos mostrando la nucleación de macromoléculas del extracto con la Plata a 0.3 micras y 6 micras, respectivamente; Figura 12.

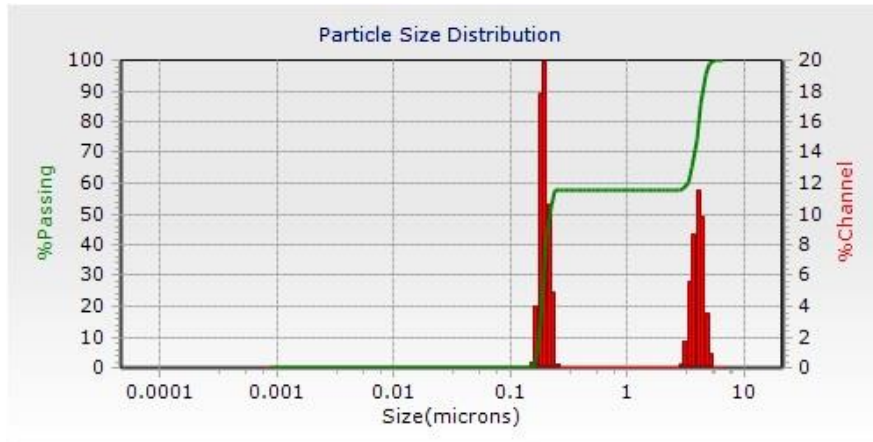


Figura 12. Tamaño de las Fitonanopartículas de Plata obtenidas en forma coloidal.

La Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), mostró un formación de Fitonanopartículas en un rango de 86 – 92 nm, tal como se ilustra en la Figura 13.

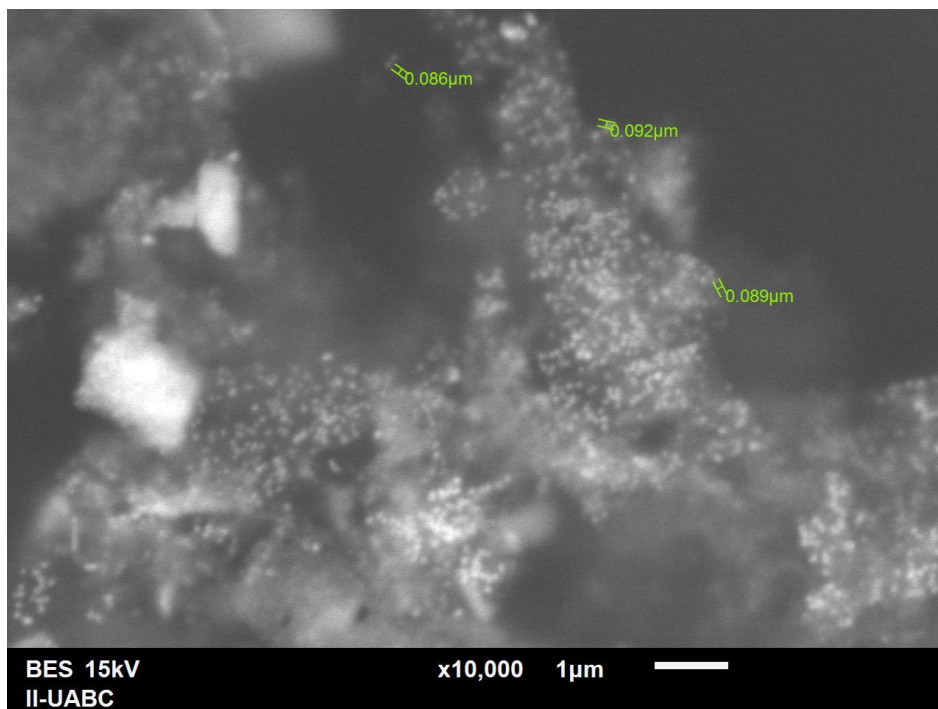


Figura 13. Tamaño de Fitonanopartículas de Plata obtenidas de los complejos precipitados de la solución coloidal.

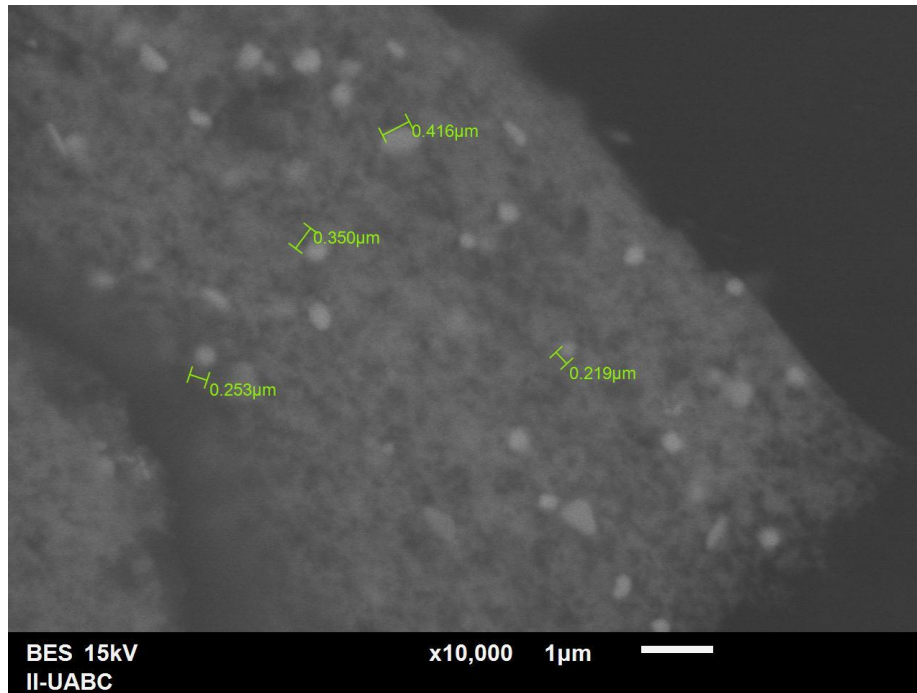


Figura 14. Tamaño de Fitonanopartículas Plata-Cobre obtenida de los complejos precipitados de la solución coloidal.

En el caso de las Fitonanopartículas de Plata-Cobre con el extracto, el análisis SEM indicó la presencia de complejos estables entre 200 a 300 nm como se indica en la Figura 14, lo que indica la formación de nanoesferas estables. Viéndose lo anterior reflejado en el análisis DLS, con la formación de Fitonanopartículas estables que van de 0.04 micras a 4 micras, como se ilustra en la Figura 15.

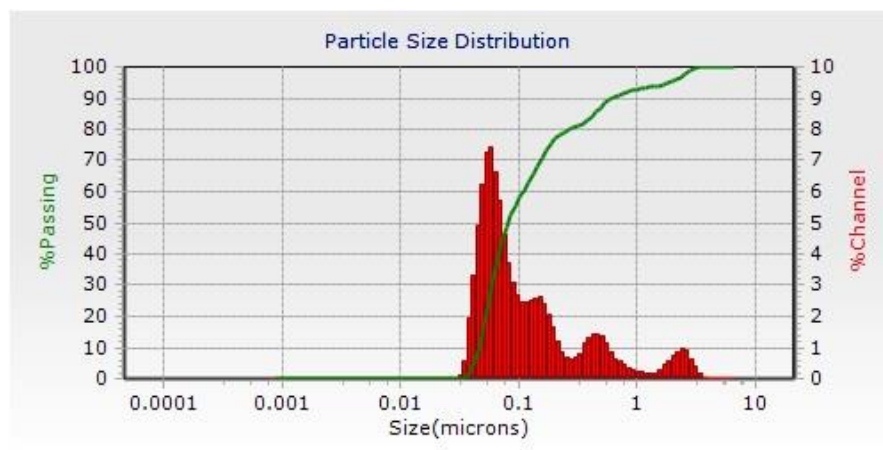


Figura 15. Tamaño de las Fitonanopartículas de Plata-Cobre obtenidas en forma coloidal.

Finalmente en el caso de las Fitonanopartículas de Cu con extracto, el DLS muestra la formación de nanocompuestos de dos tamaños; picos en 0.2 y 1 micras de gran tamaño, lo que muestra la formación de complejos menos estables y reactantes; Figura 16.

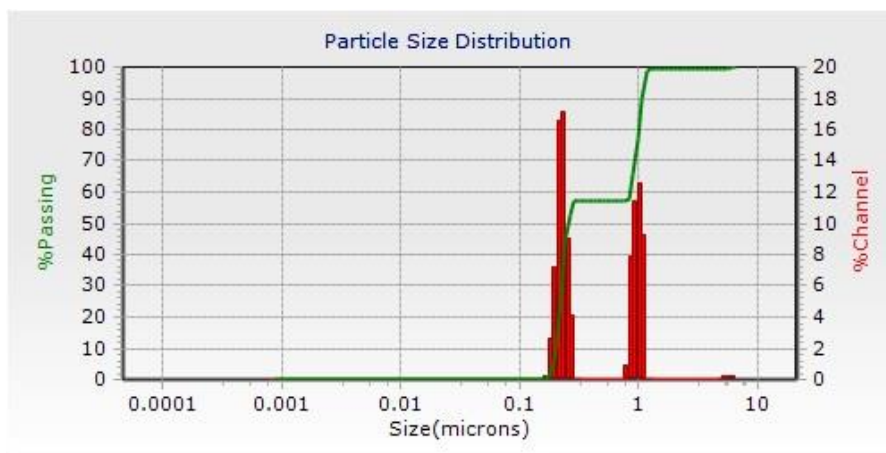


Figura 16. Tamaño de las Fitonanopartículas de Cobre obtenidas en forma coloidal.

7.2 Efectividad Biológica de Fitonanopartículas

La evaluación biológica de Fitonanopartículas de Plata contra el Hongo Fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* mostró una inhibición micelial superior al 75% en comparación con el control de Extracto Acuoso de *J. spicigera* que no mostró actividad para inhibir al patógeno al tercer día de evaluación, sino hasta el sexto y noveno día en donde el porcentaje de inhibición micelial fue inferior al 5%. Mientras que las Fitonanopartículas de Cobre y Plata-Cobre, no mostraron efectividad biológica para inhibir este patógeno, resultando las Fitonanopartículas de plata eficientes para inhibir la actividad de *Macrophomina*; Figura 17.

Por otro lado, la tendencia mostrada en la inhibición micelial del hongo *Colletotrichum* por Fitonanopartículas de Plata-Cobre fue superior al 50% en los días evaluados; mientras que el tratamiento con Fitonanopartículas de Cobre al tercer día mostró una inhibición superior al 50%, disminuyendo esta tendencia al día 6 y 9 con 40% y 35% de inhibición respectivamente. Si bien, la inhibición del Hongo *Colletotrichum* por las Fitonanopartículas de Plata no resultó ser el tratamiento más eficiente para inhibir la actividad de este hongo al día 3, no habiendo diferencia mínima significativa en la inhibición del patógeno con el tratamiento de Fitonanopartículas de Cobre al día 6 y 9. Como se muestra en la Figura 18, el control de extracto acuoso de *J. spicigera* mostró un porcentaje de inhibición micelial inferior al 5% en los días evaluados.

Macrophomina phaseolina

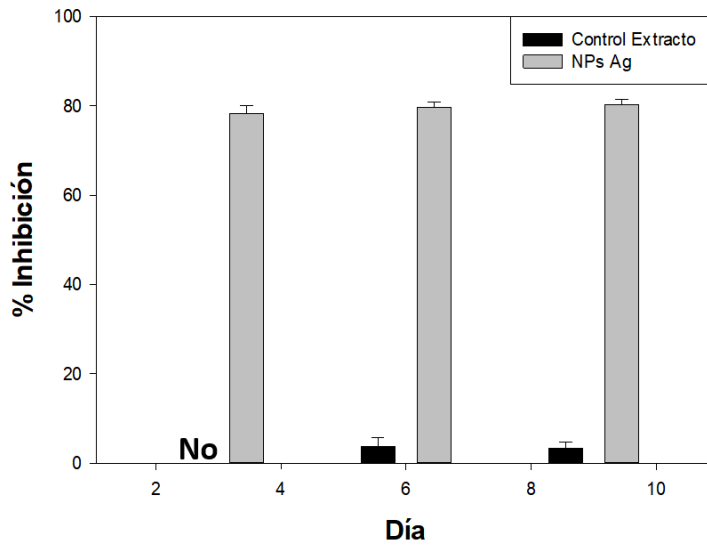


Figura 17. Gráfico de Porcentaje de Inhibición Micelial de NPs de Ag contra el Hongo *Macrophomina phaseolina* a los 3, 6 y 9 días.

Colletotrichum

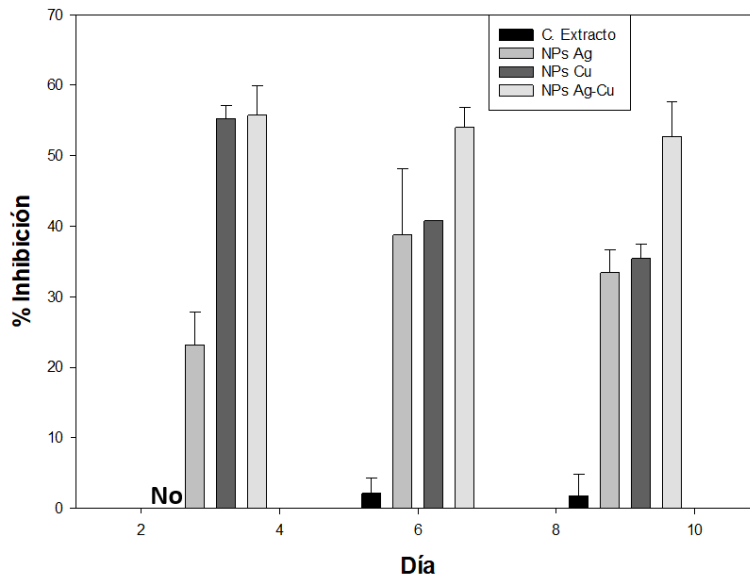


Figura 18. Gráfico de Porcentaje de Inhibición de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre contra *Colletotrichum* a los 3, 6 y 9 días.

Resulta interesante como las Fitonanopartículas de Plata-Cobre incrementan su actividad inhibitoria contra *Fusarium solani*, yendo de 26% de inhibición al tercer día, 35% de inhibición al sexto día y 41% de inhibición al noveno día, siendo este el mayor porcentaje de inhibición micelial registrado para este hongo, ya que las Fitonanopartículas de Cobre muestra actividad inhibitoria por debajo del 15%; Las Fitonanopartículas de Plata muestran una mayor actividad inhibitoria al sexto día con 37% de Inhibición. No habiendo diferencia mínima significativa entre el control (extracto acuoso de *J. spicigera*) y el tratamiento con Fitonanopartículas de Cobre; Figura 19. Es pertinente mencionar un estudio realizado en 2016 por Esparza-Arredondo (46) contra una especie de *Fusarium*, en donde evaluó de forma in vitro las nanopartículas de Oxido de Cobre obteniendo una inhibición de -13.24 % al emplear una concentración de las Nanopartículas del 25% (v/v), pero al emplear el 100% de nanopartículas sin dilución obtuvo una inhibición del 95.57% a los 7 días evaluados. Sin embargo que los resultados que se exponen en este trabajo son los obtenidos a una concentración de Fitonanopartículas del 25% (v/v).

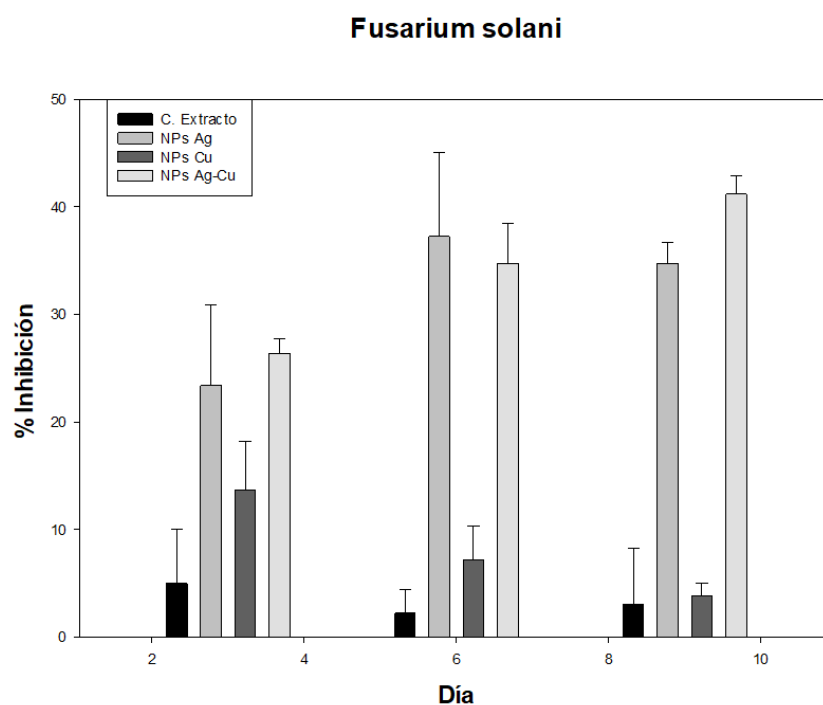


Figura 19. Gráfico de Porcentaje de Inhibición de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre contra *Fusarium solani* a los 3, 6 y 9 días.

Finalmente, las Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre no mostraron una diferencia mínima significativa en la inhibición micelial contra *Alternaria alternata* al día 3 y 6 de su evaluación, pero al día 9 el tratamiento con Fitonanopartículas de Plata muestra diferencia significativa para con los tratamientos Cobre y Plata-Cobre, como se aprecia en la Figura 20. En 2015 Deyá & Bellotti (47) evaluaron de forma

in vitro la actividad Biológica de Fitonanopartículas de Plata sintetizadas a partir del extracto vegetal de Laurel contra *Alternaria alternata* obteniendo a los 7 días de evaluación del experimento un porcentaje de inhibición micelial de 28.6%, con lo anterior queda evidenciado la efectividad de las Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre sintetizadas a partir de extracto acuoso de *J. spicigera* contra *Alternaria*.

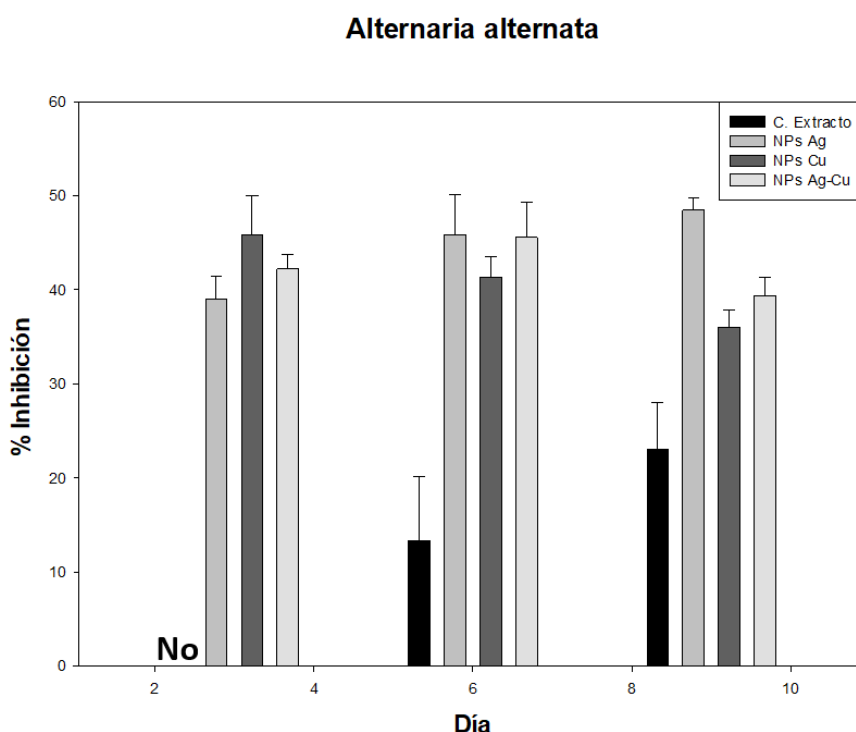


Figura 20. Gráfico de Porcentaje de Inhibición de Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre contra *Alternaria alternata* a los 3, 6 y 9 días.

Con lo anterior queda evidenciado la acción de las Fitonanopartículas metálicas contra patógenos de importancia agrícola, ya que su tamaño nanométrico les permite penetrar la pared celular dañando compuestos que posean grupos funcionales, además de provocar modificaciones morfológicas en ellos.

En la Figura 21 se puede observar el crecimiento de los diferentes hongos Fitopatógenos utilizando el método de confrontación dual con algunas modificaciones (41); empleando un “control” del experimento con Medio PDA en una de las mitades, colocando en la otra mitad Medio PDA con extracto acuoso de *J. spicigera* al 25% (v/v), mientras que los tratamientos evaluados fueron en uno de los lados Medio PDA y en el resto de la placa Medio PDA con Fitonanopartículas Plata-Cobre al 25% (v/v), pudiendo demostrar los cambios morfológicos para cada

tratamiento en comparación con el control en los días de evaluación del experimento.

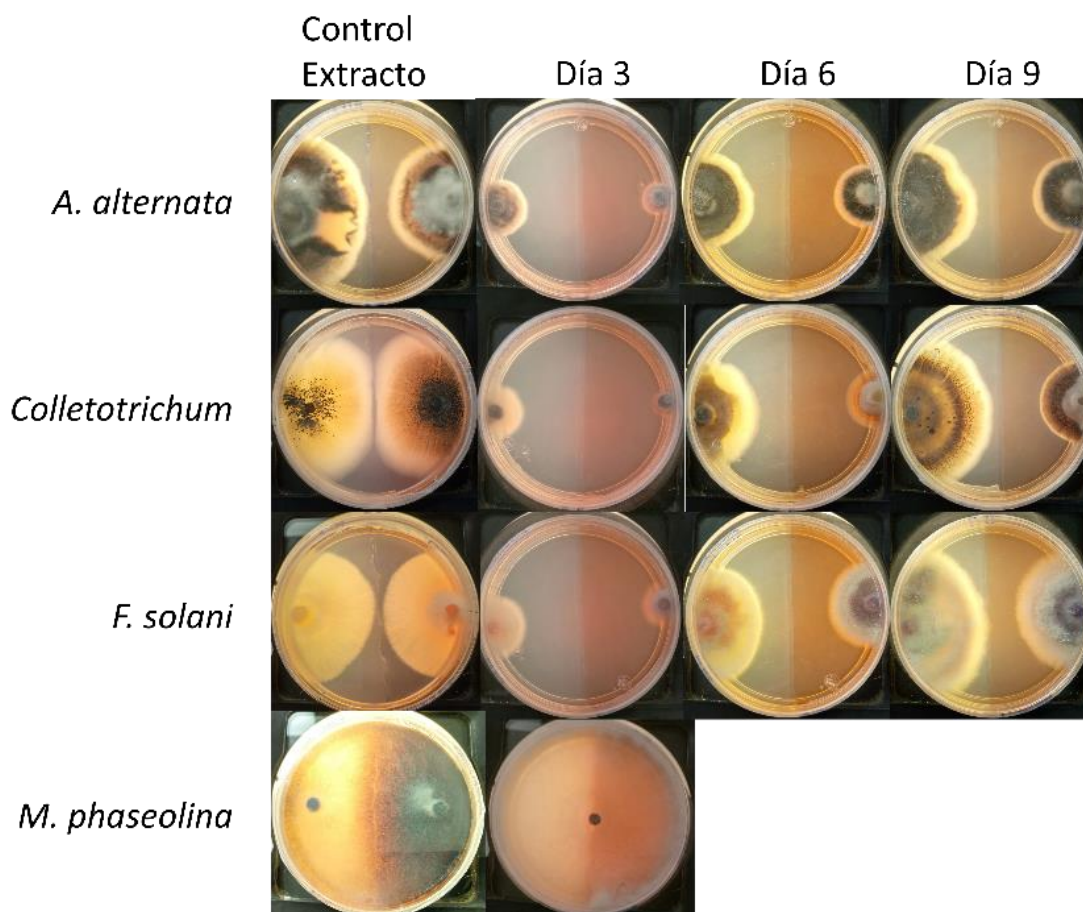


Figura 21. Crecimiento micelial de los Hongos Fitopatógenos en Medio PDA (lado izquierdo de la Placa de Petri) y Medio PDA con Fitonanopartículas Plata-Cobre (lado derecho de la Placa de Petri) al 25% (v/v).

De igual forma se muestra el crecimiento de los Hongos evaluados en el tratamiento “control” y en el tratamiento con Medio PDA y Fitonanopartículas de Cobre al 25% (v/v), tal como se ilustra en la Figura 22, en donde se muestra del lado izquierdo el nombre del hongo y en la parte superior el nombre de los tratamientos (Medio PDA en el lado izquierdo de la Placa de Petri y Medio PDA con Extracto Acuoso y/o Fitonanopartículas del lado derecho), imágenes que fueron obtenidas en los días en los que fue evaluado el experimento.

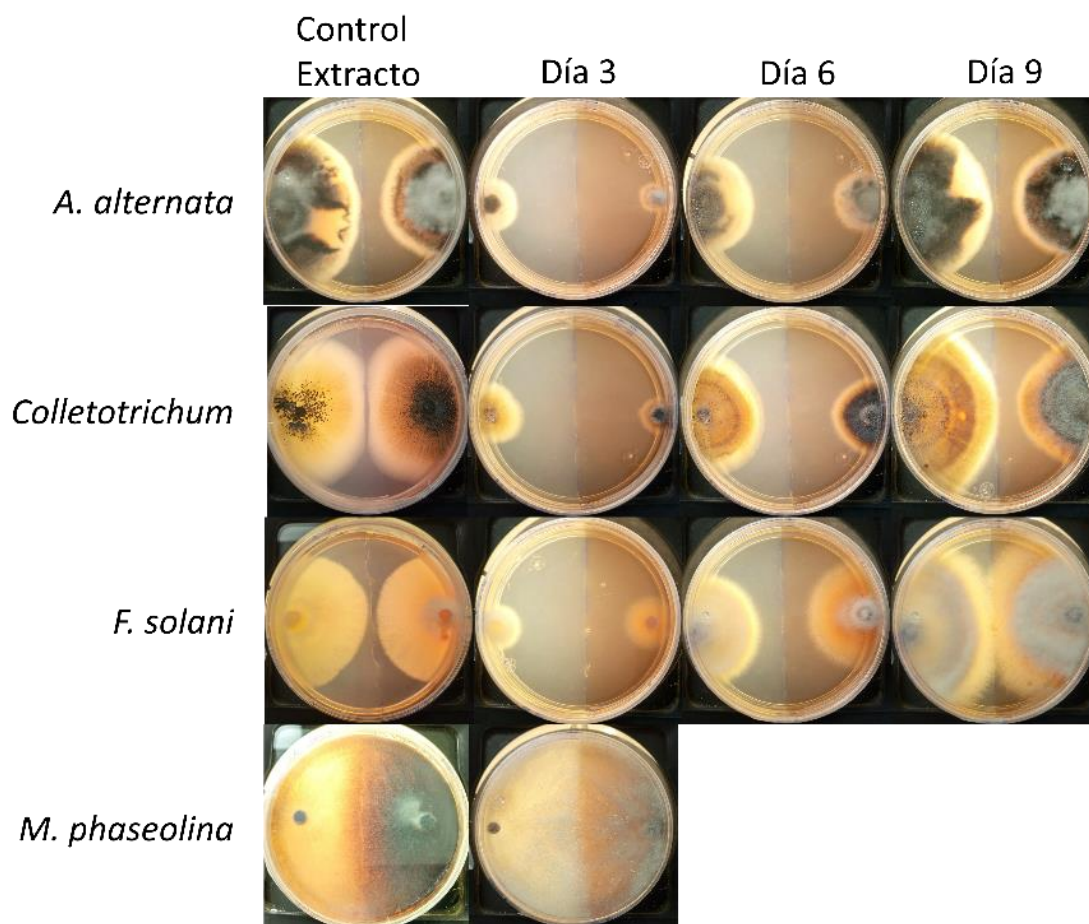


Figura 22. Crecimiento micelial de los Hongos Fitopatógenos en Medio PDA (lado izquierdo de la placa de Petri) y Medio PDA con Fitonanopartículas Cobre (lado derecho de la Placa de Petri) al 25% (v/v).

En la Figura 23 se puede observar el comportamiento de crecimiento de los Hongos Fitopatógenos con el tratamiento “control” en conjunto con los tratamientos que contenían medio PDA y Fitonanopartículas de Plata al 25% (v/v) en los nueve días que duró el experimento.

Es pertinente mencionar que en los tratamientos anteriores (Fitonanopartículas de Cobre y Plata-Cobre) no hubo inhibición con *Macrophomina phaseolina*, por ende al día 3 la placa de Petri con estos tratamientos se muestra llena al igual que su control.

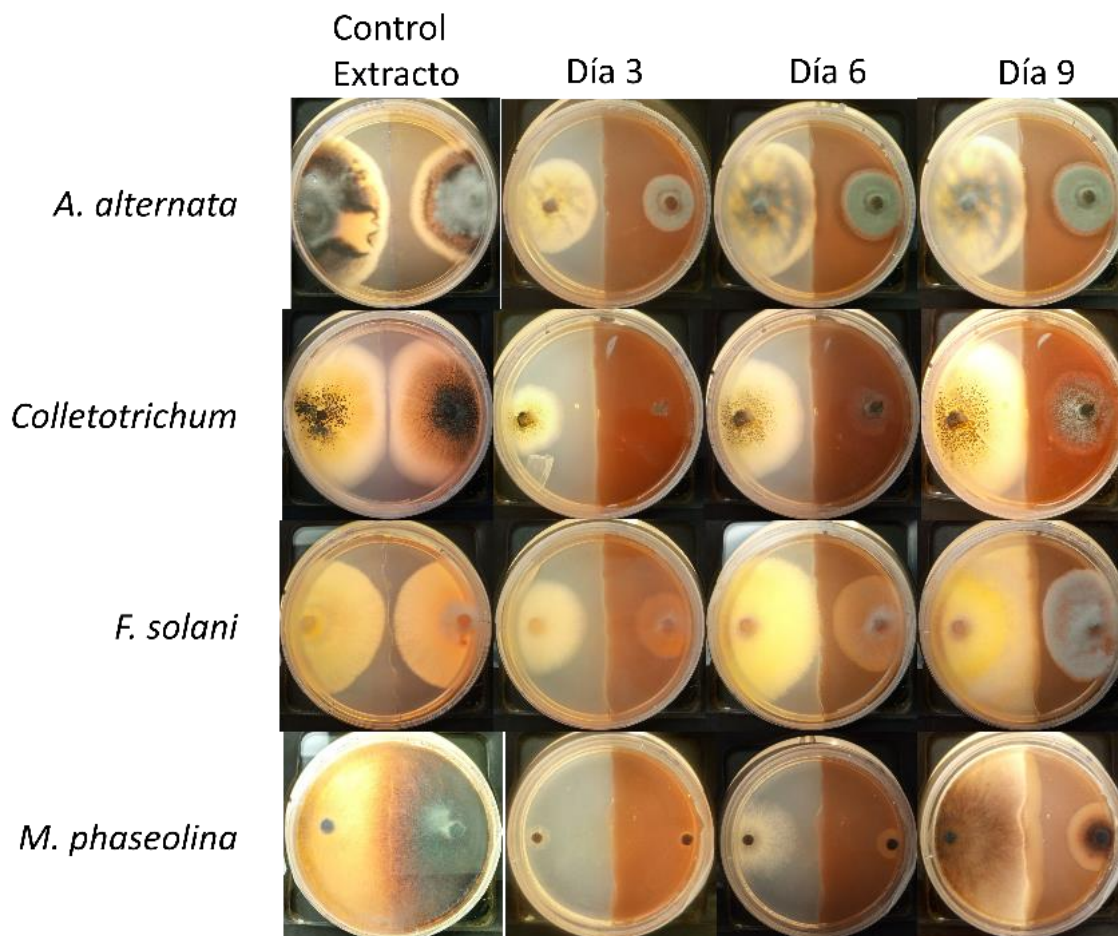


Figura 23. Crecimiento micelial de los Hongos Fitopatógenos en Medio PDA (lado izquierdo de la placa de Petri) y Medio PDA con Fitonanopartículas Plata (lado derecho de la Placa de Petri) al 25% (v/v).

7.3 Evaluación de Toxicidad en Planta de Mezquite

Estudios Toxicológicos han demostrado que el extracto acuoso de la planta *J. spicigera* no es toxica tanto para la salud humana, así como también para la fisiología de las plantas (48). Es por ello que al analizar los resultados presentados en la Tablas 7, Tabla 8 y Tabla 9 en cuanto a la evaluación de toxicidad de las Fitonanopartículas en hojas de Mezquite se puede observar una tendencia favorable para las NPs en comparación con los controles del experimento (Solución Metálica) que tienden a disminuir las concentraciones de los parámetros evaluados.

Contenido de Nitrógeno (NBI), Clorofila (Chl), Flavonoides (Flav), Antocianinas (Anth) y Concentración Media de Fluorescencia (Fv/m), fueron los parámetros medidos durante el desarrollo experimental mediante métodos no destructivos, lo que evitó la generación de residuos químicos.

Tabla 7. Datos de evaluación de toxicidad de Fitonanopartículas de Plata en partes por millón (ppm) en Hojas compuestas de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) a los tres días de evaluación del experimento.

Día 1						
	Nitrato Plata	NPs Ag				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	22.68 ± 3.37	23.37 ± 8.81	19.68±3.64	22 ± 6.79	20 ± 2.88	27.57±8.14
Chl	21.88 ± 7.84	26.17 ± 10.20	23.1±5.02	23.08±5.94	19.98±3.28	31.2 ± 11.38
Flav	1.15 ± 0.08	1.12 ± 0.03	1.18 ± 0.06	1.13 ± 0.09	1.06 ± 0.11	1.17 ± 0.16
Anth	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.075 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00
Fv/m	0.79 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.02
Día 2						
	Nitrato Plata	NPs Ag				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	18.85 ± 6.27	25.12 ± 7.65	21.15±3.39	24.44 ± 5.91	21.3 ± 4.84	27.64 ± 7.58
Chl	19.88 ± 7.45	26.52 ± 8.82	24.75±7.59	26.76 ± 5.70	21.38±3.74	32.76±10.27
Flav	1.12 ± 0.06	1.12 ± 0.03	1.17 ± 0.04	1.1 ± 0.05	1.07 ± 0.08	1.16 ± 0.07
Anth	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.06
Fv/m	0.75 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.01
Día 3						
	Nitrato Plata	NPs Ag				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	17.6 ± 5.59	27.26 ± 8.30	21.68±6.42	27.62 ± 7.76	25.98±3.91	29.15 ± 4.88
Chl	19.63 ± 4.55	30.72 ± 9.89	25.35±4.59	30.9 ± 6.70	27.6±4.37	34.5 ± 10.18
Flav	1.00 ± 0.12	1.05 ± 0.06	1.13 ± 0.06	1.04 ± 0.07	1.03 ± 0.09	1.12 ± 0.10
Anth	0.13 ± 0.06	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.07
Fv/m	0.70 ± 0.02	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.02

Tabla 8. Datos de evaluación de toxicidad de Fitonanopartículas de Cobre en partes por millón (ppm) en Hojas compuestas de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) a los tres días de evaluación del experimento.

Día 1						
	Nitrate Cupric	NPs Cu				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	21.55±8.84	19.33±2.04	17.97±1.26	19.85±2.32	22.5 ± 2.85	19.3±1.83
Chl	23.5 ± 8.51	19.25±1.51	18.58±1.71	21 ± 3.87	22.52±2.53	19.72±1.96
Flav	1.11 ± 0.07	1.23 ± 0.36	1.32 ± 0.43	1.06 ± 0.08	1.06 ± 0.07	0.98 ± 0.06
Anth	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.09 ± 0.08	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.03
Fv/m	0.77 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.00	0.77 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.77 ± 0.00
Día 2						
	Nitrate Cupric	NPs Cu				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	20.95±5.57	23.57±2.27	22.38±2.84	24.08±6.54	23.33±4.32	19.43±3.65
Chl	22.15±5.46	24.23±3.31	23.77±2.50	27.58±7.78	23.42±3.97	19.77±4.81
Flav	1.05 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.07	1.15 ± 0.06	1.04 ± 0.04	1.01 ± 0.07
Anth	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.00
Fv/m	0.74 ± 0.03	0.77 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.79 ± 0.01
Día 3						
	Nitrate Cupric	NPs Cu				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	15.04±5.22	24.1±4.92	25.4±3.16	25.98±1.06	24.95±3.62	31.72±7.49
Chl	15.7±5.38	25.2 ± 5.41	27.73±4.16	27.27±0.89	26.72±5.44	34.05±7.43
Flav	1.06 ± 0.10	1.04 ± 0.02	1.09 ± 0.10	1.01 ± 0.11	1.08 ± 0.09	1.05 ± 0.10
Anth	0.10 ± 0.04	0.07 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.01
Fv/m	0.70 ± 0.03	0.77 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.01

Tabla 9. Datos de evaluación de toxicidad de Fitonanopartículas de Plata-Cobre en partes por millón (ppm) en Hojas compuestas de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) a los tres días de evaluación del experimento.

Día 1						
	Nitrato Ag-Cu	NPs Ag-Cu				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	22.15 ± 3.97	23.77±5.93	18.18±1.47	18.07±1.62	20.72±3.88	21.28±3.44
Chl	23.97 ± 4.37	28.42±7.47	18.05±3.21	18.87±1.18	20.27±2.88	21.14±6.61
Flav	1.18 ± 0.10	1.20 ± 0.05	1.04 ± 0.17	1.07 ± 0.07	1.07 ± 0.03	1.09 ± 0.11
Anth	0.29 ± 0.36	0.06 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.04
Fv/m	0.74 ± 0.03	0.79 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.79 ± 0.01
Día 2						
	Nitrato Ag-Cu	NPs Ag-Cu				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	21.05±4.64	23.73±4.01	22.67±4.08	18.52±3.88	21.22±1.60	21.85±3.06
Chl	19.08±1.95	27.6±4.35	24.93±5.30	21.73±4.67	22.33±1.94	23.42±2.61
Flav	1.15 ± 0.07	1.14 ± 0.07	1.1 ± 0.11	1.20 ± 0.08	1.05 ± 0.05	1.02 ± 0.10
Anth	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.05
Fv/m	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.01
Día 3						
	Nitrato Ag-Cu	NPs Ag-Cu				
		100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	10 ppm
NBI	12.5 ± 2.71	22.57±4.05	28.55±4.92	20.43±5.76	31.82±9.79	22.2±4.23
Chl	14.77 ± 3.35	24.53±5.03	35.13±5.57	22.22±7.28	36.22±10.86	22.38±4.42
Flav	1.03 ± 0.04	1.12 ± 0.04	1.23 ± 0.04	1.19 ± 0.02	1.15 ± 0.05	1.10 ± 0.04
Anth	0.13 ± 0.07	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.07	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.05
Fv/m	0.70 ± 0.04	0.77 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.78 ± 0.00

El comportamiento mostrado por las Fitonanopartículas Metálicas en los parámetros evaluados deja evidenciado que no es un riesgo para la salud de la planta, sino que favorece a su fisiología aunado a que en la mayoría de los casos se registró una inhibición efectiva de los hongos Fitopatógenos; en comparación con los controles de soluciones metálicas en donde las concentraciones de los parámetros disminuyen conforme los días evaluados.

Lo anterior se ve reflejado en los daños observados causadas por las soluciones metálicas (controles del experimento) en las hojas de Mezquite, tal como se muestra en la Figura 24.

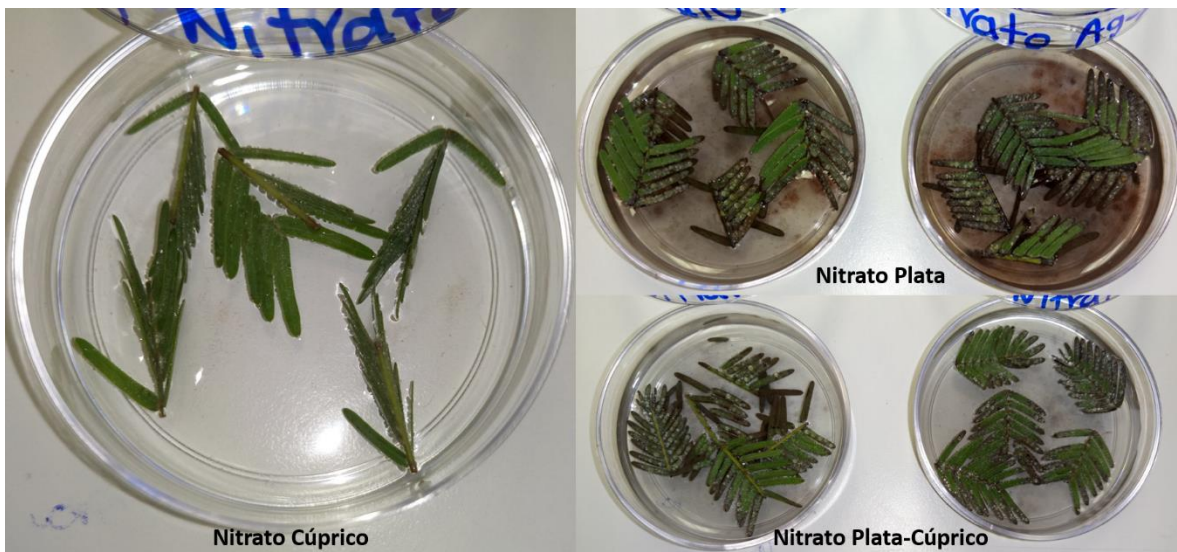


Figura 24. Reacción de las Hojas de Mezquite con las “Soluciones Controles” al tercer y último día del experimento.

Por consiguiente, en la Figura 24 queda ilustrado el efecto negativo que tienen los Fungicidas químicos en la fisiología de las plantas (49), consecuencias que no solo afectan a las plantas sino también al medio ambiente.

8. Conclusiones

En primera instancia, se puede concluir haciendo mención sobre la eficiencia de la técnica de síntesis de Fitonanopartículas propuesta a partir del extracto acuoso de *J. spicigera* que actuó como reductor y estabilizante de las moléculas metálicas (Plata, Cobre y Plata-Cobre).

Además, se obtuvieron Fitonanopartículas de tamaño nanométrico en un rango de 1 a 100 nm, siendo importante mencionar que para esta técnica de síntesis verde no se puede tener un control sobre la uniformidad dimensional de las Nanopartículas que se están sintetizando, esto en comparación con la síntesis química de nanopartículas, ya que en la síntesis verde están implicados metabolitos secundarios de estructura variada lo que provoca la formación de nanopartículas de tamaños diferentes.

Por consiguiente la evaluación biológica de las Fitonanopartículas de forma *in vitro* nos permitió concluir que, la efectividad biológica de las Nanopartículas depende de que tan susceptible sea la estructura del Hongo Fitopatógeno a las nanopartículas metálicas de interés, en este caso NPs Plata, NPs Cobre y NPs Plata-Cobre, ya que no siempre un tipo de nanopartículas tendrá la misma eficiencia sobre otro género de hongo, tal como se ilustró en la parte de Resultados, ya que se tiene que considerar la estructura bioquímica del hongo Fitopatógeno de interés.

Por otro lado, resulta interesante el no obtener efectos negativos sobre las plantas de Mezquite al evaluar la toxicidad de las Fitonanopartículas de Plata, Cobre y Plata-Cobre, en comparación con los controles (Nitrato Plata, Nitrato Cúprico, Nitrato Plata-Cúprico); aunado a que esta parte experimental fue útil para poder decir que los fungicidas químicos tienen un efecto negativo en la fisiología de la planta.

En otro orden de ideas, los resultados obtenidos y que fueron mostrados en este escrito permitieron finalizar en tiempo y forma los objetivos propuestos para este Proyecto de Residencia Profesional.

Cabe mencionar que esta investigación emerge como un parteaguas que muestra el interés de poder innovar y generar nueva información en la rama de la Biotecnología en México y sobre todo, generar nueva información en el ámbito de la AgroBio-Nanotecnología en el País, a través de la Síntesis Verde de Fitonanopartículas, basada en técnicas que favorecen al medio ambiente.

9. Recomendaciones

La recomendación para siguientes investigaciones en esta línea de investigación es la Evaluación de la Toxicidad en Campo, que permita valorar el efecto de las Fitonanopartículas en un ambiente en donde influyan más parámetros y así obtener información más concreta.

Además de proponer la evaluación de efectividad biológica de las Fitonanopartículas a una concentración del 50% o 75% (v/v), ya que en este trabajo se muestran los resultados de inhibición micelial a un 25% (v/v).

Siendo muy importante el enfocar parte de futuras investigaciones en estudiar los cambios morfológicos provocados en los Hongos Fitopatógenos por las Fitonanopartículas.

10. Cronograma de Actividades

Actividad	Semana																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Revisión de Literatura	■	■															
Diseño del Experimento			■														
Obtención de Fitonanopartículas				■	■												
Evaluación de Actividad Biológica						■	■										
Análisis Físico y Químico de las Nanopartículas								■	■								
Prueba de Toxicidad en Plantas										■	■						
Análisis de Resultados												■	■				
Escritura de Artículo Científico														■	■	■	

11. Anexos

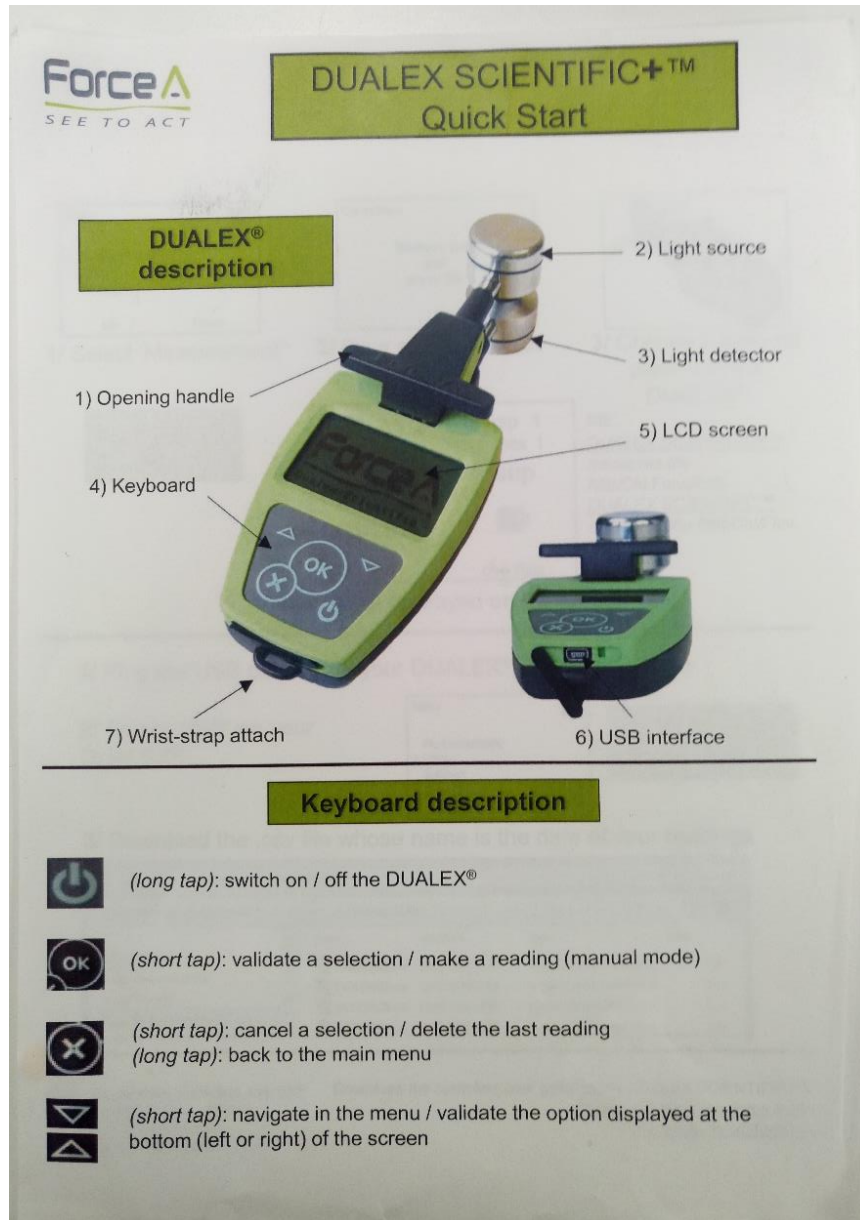
Anexo 1. Equipo Espectrofotómetro UV-Vis




Anexo 2. Dualex Scientific+™



Anexo 2. Dualex Scientific+™ - Manual de Operación



Anexo 2. Dualex Scientific+™ - Manual de Operación



DUALEX SCIENTIFIC+™

Quick Start

Menu

> Measurement <


USB

Settings

Up Down

Calibration

Remove leaf
and
press OK



1/ Select 'Measurement'
2/ Do a self-calibration (1 sec)
3/ Choose a leaf and place it in the DUALEX®

First readings

NBI 35.2	grp 1	
Chl 35.6	mes 1	
Flav 1.01	sup	
Anth 0.18		p
group+	chg side	

NB:

DUALEX SCIENTIFIC+™ measures the NBI/Chl/Flav/Anth.

DUALEX SCIENTIFIC™ measures the NBI/Chl/Flav.

4/ Values are displayed on the screen

1/ Plug the USB cable from your DUALEX® to your computer

2/ Select 'USB' on your DUALEX®

Menu

Measurement

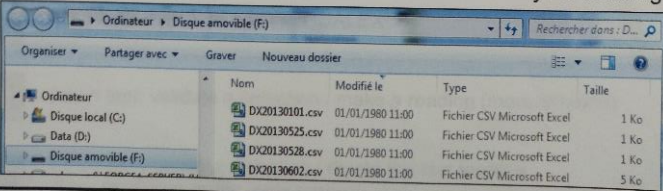
> USB <

Settings

Up Down

Data downloading

3/ Download the .csv file whose name is the date of your readings



FORCE-A

Centre Universitaire Paris Sud, Bât. 503

91893 ORSAY CEDEX - France

Tel : + 33 (0) 1 69 35 88 62

Fax : + 33 (0) 1 69 35 88 97

Download the complete user guide of the DUALEX SCIENTIFIC+™:

On our website: www.force-a.com

By e-mail: info@force-a.fr

Anexo 3. Fluorometro Opti-Sciences



Anexo 3. Fluorometro Opti-Sciences



Anexo 4. Determinación de Fenoles Totales

Fundamento de Reacción

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (50), cuya intensidad es medida para evaluar el contenido en polifenoles (Figura 25).

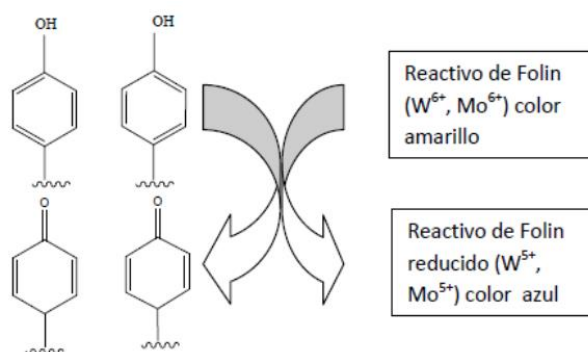


Figura 25. Mecanismo de Acción del Reactivo de Folin-Ciocalteu.

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (Figura 26). Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (50).

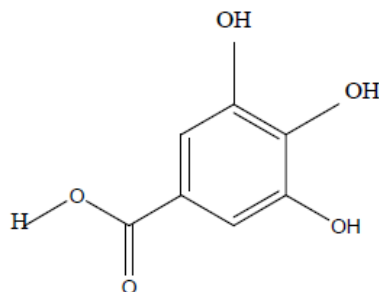


Figura 26. Estructura de Ácido Gálico.

También se pueden producir variaciones en el modo de expresar los resultados, sin embargo, el patrón recomendado es el ácido gálico.

Técnica Empleada

Los compuestos fenólicos presentes en las muestras de *J. spicigera* y de las muestras de Nanopartículas (NPs Ag, NPs Cu, NPs Ag-Cu) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. La reacción consistió en mezclar 50 μL de la muestra con 1 mL de agua destilada, a continuación se añadieron 0.5 mL de reactivo Folin Ciocalteu (1:1 con agua destilada), después se le adicionó 2.5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20%. Posterior a una agitación constante de la mezcla se dejó reposar por 40 min.

Transcurrido el tiempo, se registró la absorbancia a 725 nm usando como blanco agua, el análisis se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (mg/mL de solución), a través de una curva de calibración con ácido gálico en un rango de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (51).

Obteniendo en la curva de calibración la siguiente ecuación: $y = 0.067x - 0.026$ con una $R^2 = 0.9951$.

Anexo 5. Evaluación de Eliminación de Radicales Libres (DPPH).

Fundamento de Reacción

El fundamento de esta técnica consiste en la medición a 517 nm de la reducción del radical estable 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•), la diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres. La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso, disminuye con la presencia de un antioxidante (AH) u otro radical (R•). Es posible, por tanto, cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que producen a una solución metanólica de DPPH (Figura 27), (52).

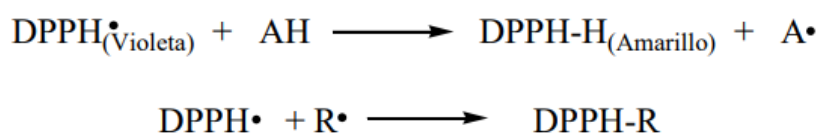


Figura 27. Reacciones con el 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (α,α -difenil- β -picril-hidrazilo (DPPH)) se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la deslocalización de un electrón sobre toda la estructura molecular, de modo que ésta no dimeriza, como sería el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta oscuro, caracterizado por poseer una banda de absorción en solución alcohólica aproximada a 520 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia que pueda donar un átomo de hidrógeno, da lugar a la forma reducida acompañado de la pérdida del color violeta y la aparición de un color amarillo pálido debido a la presencia del grupo picrilo. El primero en utilizar el método de DPPH fue Marsden Blois en 1958, él utilizó la cisteína como modelo antioxidante (Figura 28), (52).

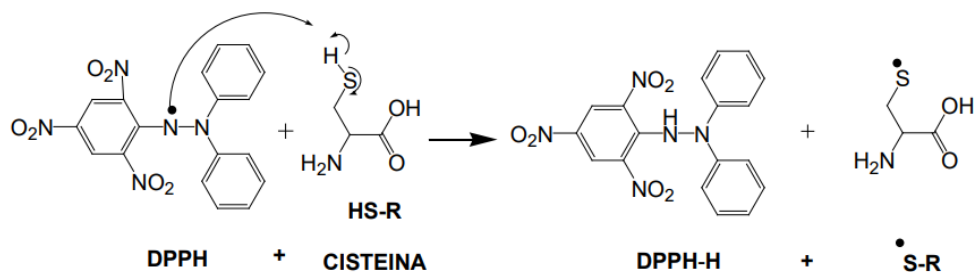


Figura 28. Reacción entre el DPPH y la cisteína.

El radical libre RS• reacciona evidentemente con otra molécula de la misma clase la cual fue producida por una reacción paralela para formar moléculas estables (Figura 29).

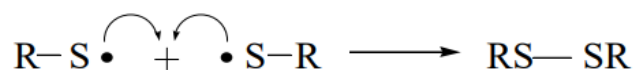


Figura 29. Descripción de la reacción del radical libre RS•.

Técnica Empleada

Fue determinada por el método 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Se tomaron 0.2 mL de muestra a evaluar (Extracto Acuoso, NPs Ag, NPs Cu, NPs Ag-Cu), posteriormente fue mezclado vigorosamente con 3.8 mL de DPPH a una concentración de 0.1 mM/L en etanol, y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos. La absorbancia fue medida a 517 nm con un espectrofotómetro UV. Utilizando como blanco agua y los resultados se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (% AA) usando la siguiente ecuación;

$$\text{AA}\% = \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs muestra}) * 100}{\text{Abs control}}$$

Donde Abs control es la absorbancia del control y Abs de la muestra es la absorbancia de la mezcla de la muestra y el radical DPPH (53).

Anexo 6. Constancia de Participación en el 5to Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores – BC 2017.



**Universidad Autónoma de Baja California
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

Otorgan la siguiente constancia a:

ERICK ANTONIO BERNARDO MAZARIEGOS

Por su destacada participación con la ponencia oral:

**FITONANOPARTÍCULAS DE JUSTICIA SPICIGERA;
ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA PARA EL BIOCONTROL DE
HONGOS VASCULARES (MACROPHOMINA PHASEOLINA) Y
RADICULARES (FUSSARIUM SOLANI)**

En el área de

CIENCIAS AGROPECUARIAS

En el marco del



Tijuana B.C. a 29 de Septiembre de 2017



Patricia Muctezuma Hernández
Dra. Patricia Muctezuma Hernández
Coordinadora de Posgrado e Investigación
Universidad Autónoma de Baja California

Anexo 7. Reconocimiento en el 5to Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores – BC 2017.



Universidad Autónoma de Baja California
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Otorgan el siguiente reconocimiento a:
ERICK ANTONIO BERNARDO MAZARIEGOS

Por haber obtenido el tercer lugar con la ponencia:
Fitonanopartículas de Justicia spicigera; Alternativa biotecnológica para el biocontrol de hongos vasculares (Macrophomina phaseolina) y radicales (Fusarium solani).

En el área de **Ciencias Agropecuarias** en el marco del



Tijuana B.C. a 29 de Septiembre de 2017


Dra. Patricia Moctezuma Hernández
Coordinadora de Posgrado e Investigación
Universidad Autónoma de Baja California


Dra. María Eugenia Pérez Morales
Vicerectora Campus Tijuana
Universidad Autónoma de Baja California

Anexo 8. Constancia de Participación en el 1er “International Symposium
2017 On AgroBio Nanotechnology” en México.



INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2017 ON AGROBIO NANOTECHNOLOGY

Se Otorga la Presente

Constancia

A: *Erick Bernardo Mazariego, Benjamín Valdez Salas,
Daniel González-Mendoza, Federico Gutiérrez Miceli,
Carlos Ceceña Duran y Dagoberto Duran Hernández,*

Por su participación con el póster titulado:

“Silver nanoparticles of *Justice spicigera* and its potential application as
biocontrol of foliar and radicular fungi”



Dr. Ricardo Hugo Lira Salazar
Organizador General Symposium



Dr. Cliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CICA



Dr. Jesús Valenzuela García
Rector de la UAAAH



Saltillo, Coah., México, 27 de Octubre, 2017

Anexo 9. Reconocimiento en el 1er “International Symposium 2017 On AgroBio Nanotechnology” en México.



**INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2017 ON
AGROBIO NANOTECHNOLOGY**

Se Otorga el Presente

Reconocimiento

A: *Erick Antonio Bernardo Mazariegos*

Por haber obtenido el **3º lugar** en la presentación del **póster** titulado:
“Silver nanoparticles of *Justice spicigera* and its potencial as biocontrol of foliar and radicular fungi”


Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar
Organizador General
Symposium


Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del
CIQA


Dr. Jesús Valenzuela García
Rector de la UAAAN







Saltillo, Coah., México, 27 de Octubre, 2017

12. Referencias Bibliográficas

- (1) E. Vega-Avila, Tapia-Aguilar R., Reyes-Chilpa R., Guzman-Gutierrez S., Pérez-Flores J., & R. Velasco-Lezama. (2012). Actividad Antibacteriana y Antifúngica de Justicia Spicigera. *Latinoamer. Quim.* , 40: (2), pp. 75-82.
- (2) Méndez-Arguello B., Vera-Reyes I., Mendoza-Mendoza E., García-Cerda L.A., Puente-Urbina B.A. & R.H. Lira-Saldívar. 2016. Promoción de crecimiento en plantas de *Capsicum annum* por Nanopartículas de óxido de zinc. *Nova Scientia. Res.* 8: 140-156.
- (3) UNAM. (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 2017, de Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana Sitio web: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=muicle&id=7981>
- (4) Naturalista. (2012). Justicia spicigera. 2017, de Naturalista Sitio web: <http://www.naturalista.mx/taxa/164323-Justicia-spicigera>
- (5) C. Monroy & R. Monroy. Las Plantas Medicinales, Compañeras de Siempre. CONABIO. Primera Edición. México. 2006. P. 114.
- (6) I. Baqueiro-Peña & J. Guerrero-Beltrá. (2014). Uses of Justicia spicigera in medicine and as a source of pigments. *Functional Foods in Health and Disease.* Vol. 4(9). Pp. 401-414.
- (7) Rosa Elena Dueñas. (2012). Extracto Fluido de Justicia spicigera. Laboratorio de Remedios Herbolarios, Vol.1, p.2.
- (8) Gomez-Verja, J.C., Reyes-Chilpa, R., Aguilar, M.I. (2012). Chemistry and pharmacology of selected Asian and American Medicinal species of Justicia. En "Bioactive Phytochemicals. Perspectives for Modern Medicine. Vol. I." Gupta, V.K. Editor. India Daya Publishing House. New Delhi, India. 1a edición. P.p. 455-473.
- (9) R. C. Hernández-Albíter, Barrera-Necha L. L., Bautista-Baños S. & L. Bravo-Luna. (2007). Antifungal Potential of Crude Plant Extracts on Conidial Germination of Two Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.. *Revista Mexicana de Fitopatología.* Vol. 25 (2). Pp. 180-185.
- (10) Domijan, A., Feraica, M., Jurjevic, Z., Ivil, D. & Cvjetkovic, B. (2005). Fumonisin B1, fumonisin B2, Zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Additives and Contaminants* 22(7), 677-680.
- (11) Lopes, M. C. & Martins, V. C. (2008). Fungal plant pathogens in Portugal: *Alternaria dauci*. *Revista Iberoamericana de Micología,* 25, 254-256.
- (12) O. Rocha, K. Ansari, & F. M. Doohan. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells. *Food Additives and Contaminants.* Vol. 22 (4). Pp. 369-378.
- (13) R. Cardona. 2006. Distribución vertical de esclerosis de *Macrophomina phaseolina* en un suelo infestado naturalmente en el estado Portuguesa. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 23: 284-291.

- (14) J. D. Mihail. 1992. Macrophomina. In: L. L. Singleton, J. D. Mihail & C. M. Rush. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press. St. Paul, MN. Pp. 134-136.
- (15) CANNA. (2013). Fusarium - Plagas y Enfermedades. 2017, de CANNA Sitio web: <http://www.canna.es/fusarium-plagas-enfermedades>
- (16) Ministerio de Agricultura Ganadería (MAG). 2008. Guanábana (*Annona muricata* L) Annonaceae, disponible en: <http://www.mag.go.cr/>
- (17) CH. Morel. (2013). Las Enfermedades: Colletotrichum. 2017, de CH. Morel Sitio web: <http://www.cyclamen.com/>
- (18) Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*: 11S-25S.
- (19) Swanson BG. 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae* 207: 49 – 61.
- (20) Zhang, X.; Yan, S.; Tyagi, R. D. and Surampalli, R. Y. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*. 82(4):489-494.
- (21) Angulo, E. M., Armenta, R. E., García, E. R., Carrillo, F. J., Salazar, V. E. & Valdez, T. J. (2009). Extractos de semilla *Swietenia humilis* Zucc. con actividad antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Enhernb.:fr.) vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2), 84-92.
- (22) Gamboa, A. R., Hernández, C. F., Guerrero, R. E., Sánchez, A. A. & Lira, S. R. (2003). Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* mont (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojasesn (*Flourensia cernua* D.C). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(001), 13-18.
- (23) Mallmann E.J.J., Cunha F.A., Castro B., Maciel A.M., Menezes E.A & P.B.A. Fachine. (2016). Antifungal Activity of Silver Naniparticles Obtained by Green Synthesis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. Vol. 57(2). Pp. 165-167.
- (24) Han, J. (2006). *Biomedical Nanoengineering For Nanomedicine*. *Tissue Engineering and artificial organs*, 289-290.
- (25) Mittal A., Chisti Y., Banerjee U. (2013), "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts", *Biotechnol Adv*, pp 346–356.
- (26) *The Chemistry of Nanomaterials. Synthesis, Properties and Applications Vols. 1 and 2* (Eds: C. N. R. Rao, A. Müller, A. K. Cheetham). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004.
- (27) L. S. Nair, C. T. Laurencin, *J. Biomed. Nanotechnol.* 2007,3, 301–316.
- (28) D. D. Evanoff, Jr., G. Chumanov, *ChemPhysChem*, 2005, 6, 1221–1231.
- (29) M. I. Litter, Armienta M. A. & S. S. Farías. (2009). Métodos Espectrofotométricos UV-Vis. En *Metodologías Analíticas para la Determinación y Especiación de Aguas y Suelos* (pp. 43-63). Argentina: CYTED.

- (30) V. Sorrivias-Lozano, Morales A. & Yañez M. J.. (2014). Principios y Práctica de la Microscopía Electrónica. Bahía Blanca: E-book.
- (31) CLEMENS, S., 2006, 'Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants', *Biochimie*, 8(11), pp. 1707-1719.
- (32) HALL JL & WILLIAMS LE, 2003, 'Transition metal transporters in plants', *Journal of Experimental Botany*, vol. 54, N° 393, pp. 2601-2613.
- (33) SHARMA SS & DIETZ KJ, 2009, 'The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance', *Trends in Plant Science*.
- (34) Naturalista. (2012). Mezquite dulce (*Prosopis glandulosa*). 2017, de Naturalista Sitio web: <http://www.naturalista.mx/taxa/58160-Prosopis-glandulosa>
- (35) Tipos de Contaminación. (2015). Ventajas y Desventajas de los Fungicidas. 2017, de Tipos de Contaminación Sitio web: <https://tiposdecontaminacion.net/ventajas-y-desventajas-de-los-fungicidas/>
- (36) D. Castillo. (1989). V Seminario Nacional de Leguminosas de Grano. Chile: Intituto de Investigaciones Agropecuarias.
- (37) Azizi S, Namvar F, Mahdavi M, Ahmad M, Mohamad R., (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles using brown marine macroalga, *Sargassum muticum* aqueous extract. *Materials* 6:5942–5950.
- (38) Sharma, G., A. R. Sharma, M. Kurian, R. Bhavesh, J.S. Nam and S.S. Lee (2014). Green synthesis of silver nanoparticle using *Myristica fragrans* (nutmeg) seed extract and its biological activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* Vol. 9, No. 1, p. 325 – 332.
- (39) Ramalingam V, Rajaram R, Premkumar C, Santhanam C, Dhinesh P, Vinothkumar S, Kaleshkumar K (2013) Biosynthesis of silver nanoparticles from deep sea bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JQ989348 for antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activity. *J Basic Microbiol* 53:1–9
- (40) Singh A, Jain D, Upadhyay MK, Khandelwal N, Verma HN (2010) Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Dig J Nanomater Biostruct* 5:483–489
- (41) A. Reyes-Ramírez, Alejo J.C., Ruíz-Sánchez E. & J.M. Tun-Suárez. (2012). Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*, Vol. 16(3), pp. 161-165.
- (42) Velásquez M., Álvarez R., Tamayo P. & C. Carvalho. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp.. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.*, Vol. 15 (1), pp. 7 - 14.
- (43) E. Delgado-Barreto, García-Mateos M.R. & M.C. Ybarra-Moncada. (2012). Propiedades Entomotóxicas de los Extractos Vegetales. *Chapingo Serie Horticultura*, Vol. 18(1), pp. 55-69.

- (44) M. Osuna-Torres & E. Tapia-Pérez. Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana para tratar Afecciones Gastrointestinales. Universidad de Barcelona. 2005, pp: 77-78.
- (45) Guerrero-Dib X., Ortiz-Méndez U., Sépulveda-Guzmán S., Ferrer-Luppi D. & M.J. Yacamán. (2009). Síntesis y Propiedades de Nanopartículas Monometálicas y bimetálicas de Oro-Plata. Ingenierías, Vol. 12, pp. 72-78.
- (46) I. J. E. Esparza-Arredondo. (2016). Potencial Antimicrobial de Nanopartículas Metálicas en Microorganismos Fitopatógenos y su Potencial como Promotores de Crecimiento en Plantas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Pp.1-53.
- (47) Deyá C. & N. Bellotti. (2015). Extractos Vegetales para la Síntesis de Nanopartículas Metálicas y su Aplicación en Pinturas como Aditivos Antifúngicos. CIDEPINT-CIC-CONICET. Pp. 368-375.
- (48) B. Peña-Agüero. (2010). Uso y Aplicación de *Justicia spicigera*. Medicina Tradicional Mexicana. Pp. 1-10.
- (49) Wikipedia. (2017). Fungicida. 2018, de Wikipedia Sitio web: <https://es.wikipedia.org/wiki/Fungicida>
- (50) García-Martínez E., Fernández-Segovia I. & A. Fuentes-López. (2012). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Universitat Politècnica de Valencia, Vol. 1, p. 1-9.
- (51) Rajendran M., Muthukumarasamy E. & B. Paulraj. (2017). Antioxidant Assay of Gold and Silver Nanoparticles from Edible Basidiomycetes Mushroom Fungi. Free Radicals and Antioxidants, Vol. 7(2), pp. 137-142.
- (52) E. Peláez-Gutiérrez. (2009). Actividad Antioxidante del Extracto en Diclorometano de *Palicourea guianensis* Aubl. (RUBIACEAE). Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira Escuela de Química.
- (53) Zhai X., Zhang C., Zhao G., Stoll S., F. Ren and X. Leng. (2017). Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. Zhai et al. J Nanobiotechnol, Vol. 15 (4), pp. 1-12.