

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Nanopartículas de Cobre y de Óxido de Zinc como Antifúngicos contra *Botrytis cinerea*
in vitro e *in vivo* en Frutos de Tomate durante Poscosecha

Por:

JORGE CORRALES FLORES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Abril de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Nanopartículas de Cobre y de Óxido de Zinc como Antifúngicos contra *Botrytis cinerea* *in vitro* e *in vivo* en Frutos de Tomate Durante Poscosecha

Por:

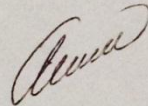
JORGE CORRALES FLORES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

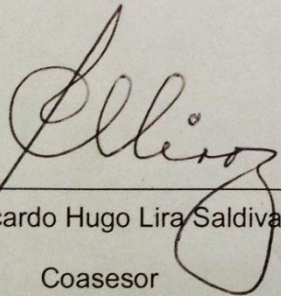
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada



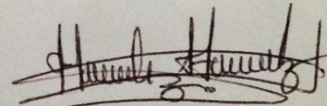
Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor Principal




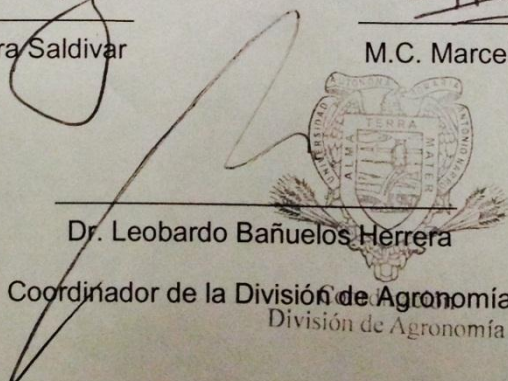
Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar

Coasesor



M.C. Marcela Hernández Suárez

Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Abril 2014

AGRADECIMIENTOS

A mi “ALMA MATER” por darme la oportunidad de formar parte de esta institución y ser uno de sus tantos egresados con orgullo.

A mis padres por el esfuerzo que hacen en darme los estudios y apoyarme en las oportunidades que se me han presentado sin importar lo que se necesite para realizarlas y por el apoyo moral y cariño que me muestran en cada momento.

A mi hermana porque siempre me dio sus consejos en la elaboración de mis trabajos y el apoyo incondicional y cariño que siempre me mostró.

A toda la plantilla de maestros y laboratoristas del departamento de Parasitología.

Muy especialmente a Cristina Sánchez por siempre brindarme su ayuda tanto fuera y dentro de la institución, muchas gracias.

Al M.C. Antonio Cárdenas Elizondo, por brindarme siempre su apoyo y compartirme de sus experiencias en la vida profesional.

Al Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar por darme la oportunidad de realizar esta innovadora investigación, por compartirme sus experiencias y por la extraordinaria disponibilidad que siempre me mostró y me sigue mostrando.

Muy especialmente a la M.C. Marcela Hernández Suárez por el apoyo incondicional que me dio durante la realización de esta investigación sin importar el trabajo que ella tuviera, Muchas gracias.

A La M.C. Gabriela Padrón Gamboa por el apoyo que me dio en la realización de los reactivos y la utilización del material de laboratorio

DEDICATORIA

A mis padres con cariño y amor

María Elva Flores Sánchez y Jorge Corrales Reynaga

Gracias por siempre darme los mejores consejos para bien mío, por darme la oportunidad de estudiar una carrera y darme el apoyo económico y moral en la toma de decisiones, por estar siempre presente y por guiarme desde pequeño sacrificando su tiempo y trabajo para ser lo que ahora soy; por mostrarme que con trabajo, esfuerzo, perseverancia y amor todo es posible, nunca me cansare de estar agradecido con ustedes y decirles que los amo por ser los mejores padres del mundo y las personas más maravillosas.

A mi hermana con cariño

Elva Gabriela Flores Corrales

Gracias por darme siempre el apoyo a lo largo de mi vida, por guiarme y aconsejarme en mis proyectos y por cuidarme, te quiero.

A mi novia con todo mi amor

Norma Edith García Hernández

A ella porque es mi motivación, por todos los momentos que pasamos desde que la conocí y por estar siempre presente, por aguantar mis enojos y mis estados de ánimo, por creer en mí y por darme la oportunidad de quererla y amarla, a ti porque me das el ánimo para realizar lo que me propongo, te dedico mi más grande proyecto que es mi tesis de licenciatura, nunca dejes de sonreír que eso es mi más grande motivación, te quiero te amo mi chiquilla.

A los lobos

Heber, Juan, Armando, Rube, Verde, Kikin, Jake, Cortes, Gera, por todos esos momentos que pasamos en compañía, la lobo-loquera, lobo-posada, los lobo-trips y por todos esos momentos en los que nos apoyamos como hermanos, como la familia que somos, los quiero y siempre los voy a llevar en mi corazón, saben que siempre van a contar conmigo en este grupo tan unido y en todo momento, que todas las metas que se pongan en esta vida las cumplan teniendo en cuenta que siempre los voy a apoyar.

A mis amigos

Francisco Javier Marín Lara (Paiza), Francisco Javier Pérez Bartolo (Japo), Jorge Valencia Valencia (Vale), Ángel Mayo (Mayo), Víctor Manuel Torres Vera (Tortas), Jesús Rosario Álvarez Silva (Chuyon), Dilmar Santiago García (Dilmar), Sandra Bautista (Sandy). Por todos esos momentos que pasamos de diversión y anécdotas que nunca olvidaré, y por el apoyo que nos dimos en cuestiones difíciles, siempre los voy a llevar en mi pensamiento y mi corazón, les deseo que logren todo lo que se proponga en esta vida.

A mis amigas

Karla Rodríguez y Guadalupe Villaseñor

Por todos los momentos que pasamos juntos, por la confianza que me tienen y por darme la oportunidad de estar con ustedes, por hacer que los días se vuelvan más divertidos estando con ustedes, gracias por todo las quiero.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
Cultivo del tomate.....	2
Origen del tomate.....	2
Ubicación taxonómica.....	3
Importancia del cultivo.....	3
Fruto del tomate.....	4
La nanotecnología en la agricultura.....	4
Uso de las nanopartículas.....	6
Nanopartículas de cobre (NPsCu)	8
Nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO).....	9
Enfermedades del tomate en poscosecha.....	9
Patógenos en poscosecha.....	10
<i>Botrytis cinerea</i>	10
Ubicación taxonómica.....	11
Descripción morfológica.....	12
Daños causados por <i>Botrytis cinerea</i>	13
Métodos de control de <i>Botrytis cinerea</i>	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Sitio del estudio.....	14

Obtención de material biológico.....	14
Producción de nanopartículas.....	15
Bioensayos <i>in vitro</i>	15
Parámetros de evaluación.....	15
Bioensayos <i>in vivo</i>	17
Parámetros de evaluación.....	17
Peroxidasa.....	20
Licopeno.....	20
Catalasa.....	20
Vitamina C.....	20
Análisis estadístico.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Efecto <i>in vitro</i> de las nanopartículas contra <i>Botrytis cinerea</i>	23
Incidencia y severidad en condiciones en temperatura controlada.....	25
Incidencia y severidad en condiciones en temperatura ambiente.....	27
Peso final, firmeza y grados Brix del fruto de tomate.....	31
Efecto de la temperatura, nanopartículas y temperatura más nanopartículas en componentes químicos del fruto del tomate.....	37
CONCLUSIONES.....	49
LITERATURA CITADA.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos <i>in vitro</i> a base de nanopartículas de cobre y óxido de zinc evaluados contra <i>Botrytis cinerea</i>	16
Cuadro 2. Tratamientos <i>in vivo</i> a base de nanopartículas de cobre y óxido de zinc evaluados contra <i>Botrytis cinerea</i> en temperatura controlada.....	18
Cuadro 3. Tratamientos <i>in vivo</i> a base de nanopartículas de cobre y óxido de zinc evaluados contra <i>Botrytis cinerea</i> en temperatura ambiente.....	18
Cuadro 4. Niveles de severidad utilizadas para evaluar el daño de <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de tomate.....	19
Cuadro 5. Concentración mínima inhibitoria y Concentración máxima fungicida de las nanopartículas de cobre.....	22
Cuadro 6. Efecto <i>in vitro</i> de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc en el crecimiento y esporulación de <i>Botrytis cinerea</i>	23
Cuadro 7. Efecto de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc en la incidencia y severidad de <i>Botrytis cinerea</i> con temperatura controlada.....	26
Cuadro 8. Efecto de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc en la incidencia y severidad de <i>Botrytis cinerea</i> con temperatura ambiente.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> y porcentaje de control por efecto de la aplicación de nanopartículas de cobre y óxido de zinc.....	24
Figura 2. Esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> y porcentaje de control por efecto de la aplicación de nanopartículas de cobre y óxido de zinc.....	25
Figura 3. Incidencia y severidad de <i>Botrytis cinerea</i> sobre el fruto del tomate y porcentaje de control del mismo, con temperatura controlada.....	27
Figura 4. Incidencia y severidad de <i>Botrytis cinerea</i> sobre el fruto del tomate y porcentaje de control del mismo, con temperatura ambiente.....	28
Figura 5. Efecto de la temperatura y las nanopartículas en la severidad de <i>B. cinerea</i> en frutos del tomate.....	29
Figura 6. Efecto de la temperatura y las nanopartículas en la incidencia de <i>B. cinerea</i> en frutos del tomate.....	30
Figura 7. Peso de frutos 7 días después de aplicar las nanopartículas.....	31
Figura 8. Efecto de las nanopartículas en la firmeza de frutos de tomate.....	32
Figura 9. Efecto de las nanopartículas en los grados Brix.....	33
Figura 10. Efecto de la temperaturas en peso de frutos, severidad de la enfermedad y grados Brix.....	34
Figura 11. Diferencia de peso 7 días después de aplicar las nanopartículas.....	35
Figura 12. Efecto de la temperatura y nanopartículas en la firmeza del fruto.....	36
Figura 13. Efecto de la temperatura y nanopartículas en los grados Brix.....	37
Figura 14. Efecto de la temperatura en la enzima peroxidasa.....	38
Figura 15. Efecto de la temperatura en la enzima catalasa.....	39
Figura 16. Efecto de la temperatura en el pigmento licopeno.....	40
Figura 17. Efecto de la temperatura en la vitamina C.....	41
Figura 18. Efecto de las nanopartículas en la enzima peroxidasa.....	42
Figura 19. Efecto de las nanopartículas en la enzima catalasa.....	43

Figura 20. Efecto de las nanopartículas en el pigmento licopeno.....	44
Figura 21. Efecto de las nanopartículas en la vitamina C.....	45
Figura 22. Efecto de las nanopartículas y temperatura en la enzima peroxidasa.	46
Figura 23. Efecto de las nanopartículas y temperatura en la enzima catalasa.....	47
Figura 24. Efecto de las nanopartículas y temperatura en el pigmento licopeno.	48
Figura 25. Efecto de las nanopartículas y temperatura en la vitamina C.....	49

INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate es vulnerable a ataques de plagas y enfermedades que pueden causar la pérdida total del producto, una de las enfermedades que tiene un importante impacto económico en este cultivo es el moho gris causado por el hongo *Botrytis cinerea*, ya que afecta a la planta durante su desarrollo y al fruto, durante el ciclo del cultivo así como en poscosecha. Para el control de esta agresiva enfermedad normalmente se recurre al uso de fungicidas sintéticos de diferentes características, pero que siempre ocasionan un severo impacto en los humanos y los ecosistemas (Chen *et al.*, 2001). Sin embargo, las nuevas estrategias de control se enfocan a emplear inductores de resistencia (Bayers *et al.*, 2014) y nuevos biocompuestos de bajo o nulo impacto ambiental (Lira-Saldivar *et al.*, 2012).

Una nueva herramienta para el control de enfermedades en humanos y plantas es mediante el uso de la nanotecnología y específicamente con el uso de nanopartículas, ya que se ha demostrado que diversos materiales logran la inhibición del crecimiento de muchos microorganismos patogénicos de humanos y de algunos fitopatógenos (Betancourt *et al.*, 2014). El creciente desarrollo en las últimas décadas de la nanotecnología ha abierto nuevas posibilidades en el campo de la ciencia y la técnica, que abarcan desde aplicaciones en electrónica y comunicaciones, hasta biología, bioquímica y medicina (Ghormade *et al.*, 2011).

Estas técnicas tienen un gran potencial en agricultura, por ejemplo para la formulación de nanocápsulas con insecticidas, fungicidas, herbicidas o fertilizantes, algo que ya están intentando desarrollar las multinacionales más importantes del sector (Bruna *et al.*, 2012). El desarrollo de estas tecnologías en ciencias agrarias podría permitir su explotación aplicada en sanidad vegetal o su uso en estudios de interacción planta-patógeno, por lo tanto esta tesis tiene como objetivo evaluar la efectividad *in vivo* e *in vitro* de NPsCu y NPsZnO como alternativas de prevención de *B. cinerea* en frutos de tomate, para prolongar la vida de anaquel.

Palabras clave: nanotecnología, nanopartículas de cobre, nanopartículas de óxido de zinc, *Botrytis cinerea*, tomate.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Cultivo de tomate

El tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es un cultivo alimentario de adopción reciente que se ha popularizado fundamentalmente durante el siglo pasado. Su versatilidad para consumo en fresco o en conserva y su adaptabilidad han jugado un papel fundamental en su rápida y extensa utilización.

La producción y consumo de tomate en el mundo ha crecido dramáticamente en las dos décadas pasadas. A pesar de la significación nutricional del tomate como fuente de vitaminas A y C, su consumo per cápita es aproximadamente cuatro veces mayor en los países desarrollados comparados con los países en desarrollo. En muchas partes del mundo, el tomate sigue siendo un cultivo menos de consumo de lujo, y existen todavía importantes oportunidades para incrementar su contribución al bienestar en la nutrición de la humanidad.

Origen del tomate

El tomate, y las plantas más relacionados con él, tienen su centro de origen en una región montañosa, estrecha y alargada de los Andes en Perú, Ecuador y Chile. Además, algunas plantas claramente emparentadas con el tomate cultivado son parte de la flora nativa de las islas Galápagos. Estos parientes primitivos del tomate ocupan muchos ambientes diversos y distintos, y representan una fuente de genes casi inagotable para la mejora genética de la especie. La domesticación y cultivo del tomate fuera de su centro de origen parece que tuvo lugar inicialmente en las primeras civilizaciones de México. El nombre *tomate* deriva aparentemente de la legua Náhuatl

de México y variantes de este nombre han seguido al tomate en su distribución a través del mundo.

Ubicación taxonómica

La clasificación taxonómica ha sido tema de numerosos debates recientes, a medida que nueva información y colecciones de la vasta diversidad en el género han obligado a reevaluar los tratamientos taxonómicos anteriores. El tomate cultivado es referido comúnmente como *Lycopersicon esculentum* Mill.; sin embargo, también se han utilizado nombres alternativos (*Solanum lycopersicon* L. y *L. lycopersicon* (L.) Karsten).

El debate actual sobre la nomenclatura es resultado de una desviación de las reglas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica en la determinación del ampliamente utilizado nombre *L. esculentum*. Propuesto por Miller en 1768 para reemplazar el nombre conferido por Linneo *S. lycopersicon*. De acuerdo con el convenido en el Código, el nombre de la especie *Lycopersicum*, debería haber sido retenido después de la aceptación del nuevo género *Lycopersicon*; sin embargo y con objeto de evitar más confusión en la nomenclatura, el razonamiento de muchos sistemáticos para denominar al tomate cultivado se ha basado más en la tradición que en el respeto a lo convenido y han propuesto la adopción de la prolongadamente utilizada nomenclatura de *Lycopersicon esculentum*.

Importancia del cultivo del tomate

La demanda del fruto del tomate tanto en fresco como para la industria aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la

producción de los últimos años se debe, principalmente, al aumento en el rendimiento y, en menor proporción, al aumento de la superficie cultivada (FAO, 2009). México se encuentra en el décimo lugar a nivel mundial en la producción de tomate, sin embargo, ocupa el primer lugar en exportación del fruto según datos de la (SAGARPA 2011); su principal mercado es Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) con 95%. Los estados con mayor aportación son Sinaloa, Baja California, Michoacán, Zacatecas y Jalisco (SIAP, 2011); juntos totalizan 68% de la producción nacional (FAOSTAT, 2011).

Dada la importancia que tiene el cultivo de hortalizas en México el cual representa alrededor del 3 al 5% de la superficie agrícola, el 18% del valor total de la producción nacional así como el 50% del valor de las exportaciones (SIAP, 2012), El tomate es la segunda especie hortícola más importante por la superficie sembrada, que es de aproximadamente 121,688 ha ubicadas principalmente en los estados de Sinaloa, Baja California, San Luís Potosí y Michoacán; registrando un volumen de producción de 2,134,839 ton/año.

Fruto del tomate

El fruto de tomate contiene de 94% a 95% de agua; siendo el 5 a 6% restante una mezcla compleja en la que predominan componentes orgánicos que dan al fruto su textura y sabor característicos. Los principales determinantes del sabor del tomate son los azúcares libres y ácidos orgánicos: sin embargo, también parecen contribuir al típico sabor del tomate la textura del fruto y otros componentes orgánicos complejos. El ambiente del cultivo puede influir marcadamente sobre la tasa de crecimiento, el cuajado de los frutos, el rendimiento y la calidad del fruto.

La Nanotecnología en la agricultura

La nanotecnología trabaja con materiales y estructuras cuyas magnitudes se miden en nanómetros, lo cual equivale a la milmillonésima parte de un metro. Un nano material tiene propiedades morfológicas más pequeñas que una décima de micrómetro en, al menos, una dimensión; en otras palabras, considerando que los materiales deben tener alto, ancho y largo, una de estas tres dimensiones es menor a la décima parte de un metro dividido en 1 millón (Liu *et al.*, 2009). La nanotecnología (NT) representa una de las más novedosas innovaciones científicas, y en muchos sentidos, la de mayor alcance en lo referente a la alta tecnología para la agricultura y los alimentos frescos (Gruere, 2012).

Se estima que en la actualidad en todo el mundo hay más de 300 nano productos alimenticios disponibles en el mercado y se prevé que para el 2015 la NT se utilizará en el 40% de las industrias alimentarias, así como para una amplia gama de sectores industriales de consumo (Ghormade *et al.*, 2011). Acorde con reciente información de la FAO, el advenimiento de la NT ha desatado enormes perspectivas para el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones para una amplia gama de sectores industriales y de consumo.

Los nuevos desarrollos tecnológicos han abierto ya una industria de billones de dólares durante los últimos años, cuyo impacto sobre el mercado global se espera que llegue a \$1 billón de USD para el año 2015 y con alrededor de 2 millones de trabajadores involucrados en esta nueva área tecnológica. Mientras la mayoría de la manufactura y uso de los materiales a nano escala sucede en los Estados Unidos, la Unión Europea, con cerca del 30% global del sector, no está muy rezagada en este campo. Al igual que en otros sectores, la NT promete revolucionar y eficientar toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el procesamiento, almacenamiento, industria de telecomunicaciones y desarrollo de materiales innovadores, productos y aplicaciones entre muchas otras áreas del conocimiento humano (Markovic *et al.*, 2012).

A pesar de que las posibles aplicaciones de la NT son muy vastas, las aplicaciones actuales en el sector alimentario y agrícola son relativamente pocas, debido a que la nanociencia se encuentra en un estado emergente. Una visión general de más de 800 productos de consumo basados en NT que están actualmente disponibles a nivel mundial, sugiere que sólo alrededor del 10% de ellos son alimentos, bebidas y productos de envasado de alimentos. Sin embargo, los productos y aplicaciones derivados de la NT de estos sectores han ido en constante aumento en los últimos años, y se prevé que siga creciendo rápidamente en el futuro (Mendoza-Uribe y Rodríguez-López, 2007). Esto se debe a que las nuevas tecnologías tienen un gran potencial para hacer frente a muchas de las necesidades actuales de la industria.

Uso de las Nanopartículas

La exitosa aplicación de varios nano productos en la medicina en condiciones *in vitro* han generado interés en la agro-nanotecnología. Procesos como la nanoencapsulación muestran el beneficio de un uso más eficiente y un manejo más seguro de los plaguicidas con menor exposición al medio ambiente que garantiza la eco protección (Chinnamuthu y Boopathi, 2009)

La aceptable eficiencia y efectos de varias nanopartículas en el crecimiento y funciones metabólicas varían entre las plantas. La transformación de plantas mediada por nanopartículas tiene el potencial para la modificación genética de las plantas para su posterior mejora. Específicamente, la aplicación de tecnología de nanopartículas en los objetivos de patología de plantas, problemas agrícolas específicos e interacciones planta-patógeno, y ofrecen nuevas formas de protección de los cultivos (Nair *et al.*, 2010).

La nanotecnología abarca una serie de diferentes tecnologías basadas en la manipulación de la materia a escala atómica y molecular. La National Nanotechnology

Initiative de los Estados Unidos define: “nanotecnología es la manera en que los descubrimientos en la nano escala son puestos a trabajar. La nanotecnología es más que juntar nanomateriales requiere la habilidad de manipular y controlar esos materiales de forma útil” (NNI, 2007). Las nanopartículas son gran relevancia en la investigación científica, debido a que tienen una amplia variedad de aplicaciones potenciales en los campos biomédico, biológico, óptico y electrónico, entre otros.

El uso principal de las NPs en la industria alimentaria se debe a su actividad antimicrobiana, por ejemplo el dióxido de titanio, es un colorante alimentario que puede utilizarse como barrera de protección en el envasado de alimentos o las NPs de plata utilizadas como agentes antimicrobianos en los paneles de los refrigeradores y frigoríficos, así como en los recipientes de almacenamiento, líneas de envasado y otras superficies destinadas a entrar en contacto con los alimentos (Allhoff y Lin, 2008). Las NPs orgánicas se emplean principalmente para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, utilizándose como vehículo para la liberación de vitaminas y otros nutrientes en nanocápsulas (Zhang *et al.*, 2006).

La nanociencia y nanotecnología están fijando nuevas fronteras en este siglo y cambiando paradigmas. Su aplicación a la agricultura y al sector de alimentos es relativamente reciente comparado con el uso de nanotecnología en la sector farmacéutico. Aplicaciones de nutrientes, bioseparación de proteínas, el rápido muestreo de contaminantes biológico y químicos, y la nanoencapsulación de nutraceuticos son algunos de los temas emergentes de la nanotecnología para la industria de alimentos y la agricultura (García *et al.*, 2010).

Agroquímicos con nano formulaciones son empleados para incrementar la eficacia de los agroquímicos comparados con las formulaciones convencionales. Solo algunos pesticidas con nano formulaciones fueron identificados con disponibilidad en el mercado. Residuos de estos productos pueden estar presentes en productos

consumibles. Además, las nanopartículas son usadas para propósitos de limpieza en agua y suelos, aun así, los cultivos no están excluidos, resultando en la exposición potencial para el consumidor (Bouwmeester *et al.*, 2009).

Comparado con los convencionales u otros contaminantes, las Nanopartículas dan un nuevo reto ambiental para los científicos y para los ambientalistas en todo el mundo, el uso de nanotecnología en la agricultura ha sido más teórica, pero ha empezado a tener un efecto significativo en las principales áreas de la industria de alimentos, en plantas se ha utilizado para combatir las infecciones patogénicas, suplementos de nutrientes y como reguladores de crecimiento (Thul *et al.*, 2013).

Nanopartículas de Cobre (NPs Cu)

Las nanopartículas de diferentes metales han sido aplicadas en optoelectrónica, nanoelectrónica, nanosensores, almacenamiento de información y la catálisis. Entre las diversas partículas de metal, las nanopartículas de cobre han tenido más atención debido a sus aplicaciones antibacterianas y antifúngicas (Ramyadevi *et al.*, 2011). Las nanopartículas de óxido de cobre de acuerdo a recientes investigaciones (Ren *et al.*, 2008) resultaron efectivas matando un rango de bacterias patogénicas involucradas en infecciones contraídas en hospitales, en comparación con nanopartículas de plata y nanopartículas de cobre, altas concentraciones de nanopartículas de óxido de cobre fueron requeridas para tener un efecto bactericida (Ren *et al.*, 2008).

Los metales plata y cobre son tradicionalmente bien conocidos como materiales antimicrobiales. Se ha considerado que estos metales reaccionan con proteínas combinando el grupo de enzimas SH, dada esta reacción se hace la inactivación de proteínas (Jeon *et al.*, 2003). Cuando estos materiales son preparados en la forma de muy pequeñas partículas, se espera que resulten con mejores características antimicrobiales porque tienen un área de aplicación específica (Yoon *et al.*, 2006).

Nanopartículas de Óxido de Zinc (NPs ZnO)

Comparado con materiales orgánicos, los materiales inorgánicos como lo es el óxido de zinc poseen una superior durabilidad, una mejor selectividad y resistencia al calor. Además el zinc es un elemento mineral esencial para la salud humana. El ZnO es una forma en diaria de suplemento del zinc. Además las nanopartículas de óxido de zinc tienen también una biocompatibilidad con las células humanas (Padmavathy y Vijayaraghavan 2008).

La actividad antibacteriana y antifúngicas del uso de nanopartículas en especial el uso de nanopartículas de óxido de zinc, se han demostrado en las investigaciones recientes. Es cierto que entre más pequeño sea el tamaño de la partícula de ZnO, más fuerte es su actividad antimicrobial (Yamamoto, 2001)

Métodos como el ensayo de conductividad indirecta se han usado para investigar la mínima actividad antibacterial de polvos cerámicos, entre estos las Nanopartículas de óxido de zinc se encuentran en la vanguardia de la investigación debido a sus propiedades únicas y aplicaciones generalizadas. La ventaja de usar nanopartículas de óxido de zinc es que estas inhiben fuertemente la acción de microbios patogénicos cuando se usan en concentraciones pequeñas, puesto que las nanopartículas de óxido de zinc poseen actividades antifúngicas y antibacteriales a bajas concentraciones, además el uso de nanopartículas de óxido de zinc no afecta la fertilidad del suelo en comparación con los agentes antifúngicos tradicionales (Ruparelia *et al.*, 2008).

Enfermedades del tomate

Las enfermedades constituyen el factor limitante en la producción de tomate en muchas partes del mundo cuando no se utilizan las medidas debidas para su control, existen cerca de 200 enfermedades del tomate de diversas causas y etiologías, para cuyo control se utilizan cultivares resistentes, microorganismos antagonistas así como medidas de exclusión, erradicación y protección en el contexto de un programa de control integrado. (Robles-Carrión *et al.*, 2011; Nuez, 2001). Las enfermedades parasíticas son aquellas que son causadas por bacterias, fitoplasmas, hongos, virus y viroides, nematodos, insectos y plantas fanerógamas parasitas. Para que la enfermedad pueda desarrollarse es necesaria la presencia de un huésped, un agente patogénico, y del ambiente adecuado.

Patógenos en poscosecha

Uno de los agentes patogénicos que ataca a este cultivo y sus frutos son los hongos, las esporas de los hongos son diseminadas fácilmente por el viento la lluvia, las salpicaduras de agua, por personas, animales y plantas. Los hongos sobreviven en plantas vivas o muertas, en suelo y en o sobre insectos, como son: El chancro negro (*Alternaria alternata*, *A.lycopersici*), antracnosis (*Colletotrichum* spp.), podredumbre del fruto (*Phytophthora parasitica*), fusariosis (*Fusarium oxysporum*), mildiu (*P. infestans*) entre otras una de las enfermedades que más daño provoca en la poscosecha es el moho gris o podredumbre causado por el hongo *B. cinerea* (Ruiz-Martinez *et al.*, 2012)

Botrytis cinerea

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos de gran importancia ya que se encuentran ampliamente distribuidos. Este género cuenta con 22 especies, dentro de las cuales tenemos a *B. tulipae*, *B. squamosa* y *B. fabae*, que afectan al tulipán, cebolla y haba respectivamente. Otra especie conocida es *B.cinerea*, la cual es capaz de infectar a innumerables especies de plantas, causando la enfermedad conocida como “podredumbre gris” (Buitrón, 2012)

B. cinerea es uno de los patógenos fúngicos más importantes, debido a su naturaleza patogénica que le permite realizar su ciclo infectivo sobre las plantas y su naturaleza saprofita que le permite vivir sobre material vegetal senescente, muerto o previamente infectado por otros patógenos (Chase, 2000).

RossenInboich y Stuebler (2000) publicaron que después de la infección y de la muerte de los tejidos vegetales, *B. cinerea* puede sobrevivir y esporular produciendo estructuras de resistencia como los esclerocios, conidios y clamidosporas. Estas estructuras se forman en superficies y restos vegetales e incluso en el suelo.

Este hongo, ubicuo y muy polífago, es observado en tomate en prácticamente todas las zonas productoras del mundo, donde puede ser origen de daños puntualmente importantes. Aunque ataca tanto al aire libre como bajo cubierta, en algunos invernaderos, hasta el 25% de las plantas puede verse afectadas. Las podredumbres en fruto son también muy perjudiciales, tanto en invernadero como al aire libre, durante el cultivo y después de la recolección (durante el almacenamiento, transporte y comercialización). Todos los órganos aéreos del tomate pueden verse afectados, en cualquier momento de su desarrollo (Blancard, 2011).

La esporulación puede comenzar 3 días después de las primeras contaminaciones. La diseminación se efectúa sobre todo por medio del viento y de las corrientes de aire, y en menor grado por la lluvia y salpicaduras de agua. También es transmitida por los obreros durante las operaciones culturales. El micelio es origen de contaminaciones por contacto de tejidos enfermos a tejidos sanos *B. cinerea* puede acabar por producir en los tejidos alterados pequeños esclerocios lisos, que permiten también su conservación. En condiciones favorables, la duración de un ciclo es bastante corta, del orden de 4 días (Blancard, 2011).

Ubicación taxonómica

De acuerdo con la clasificación, *B. cinerea* es el nombre que recibe el estado conidial imperfecto de la especie, mientras que al estado sexual se le denomina *B.fuckeliana*. En efecto, el binomio latino *Botrytis cinerea* es el más usado, debido a que se encuentra ampliamente reconocido por micólogos y fitopatólogos, ya que es el estado imperfecto el más extendido en la naturaleza (Fernández, 2006).

En relación a lo anterior mencionado Fernández (2006), ubica taxonómicamente a *B. cinerea* de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Leotiomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: Botryotinia

Especie: *B. fuckeliana*.

Descripción morfológica

B. cinerea se caracteriza por desarrollar un ciclo de vida asexual y uno sexual. Es la reproducción asexual la que más frecuentemente se encuentra en la naturaleza y, por tanto, la que está más ligada al desarrollo del hongo (Fernández, 2006). La presencia de *B. cinerea* es determinada mediante la identificación de abundantes

micelios grises, conidióforos largos y ramificados, células apicales redondeadas que producen racimos de conidios ovoides o esféricos unicelulares hialinos o levemente coloreados. La principal característica de los conidióforos y los racimos de conidios de la especie *B. cinerea* es su semejanza a un racimo de uvas (Ribera, 2007).

Las colonias del hongo tienen un crecimiento moderado, pueden ser blancas o grises dependiendo del medio de cultivo y, además, estas puede ser de tipo micelial o esporulante. El crecimiento micelial es abundante, algodonoso y de color pardo. El crecimiento esclerocial es lento, posee un micelio escaso de color blanco que luego se torna de color gris pardo con abundantes esclerocios de color negro distribuidos irregularmente en el medio (Martínez, 2008)

Daños causados por *Botrytis cinerea*

Los síntomas provocados por este patógeno, incluyen: pudrición en frutos y tubérculos, marchitez del tejido, pústulas y manchas foliares, caída de plántulas, chancros en los tallos, y tizones en inflorescencias (Ribera, 2007). El micelio del hongo produce numerosos conidios que ocasionan más infecciones, pero el micelio también se desarrolló, penetra e invade al resto de la inflorescencia, la cual se llena y cubre con moho intrincado de color gris blanquizco o café claro. En caso de que algún fruto llegue a desarrollarse, el hongo se propaga desde los pétalos hacia los frutos verdes o maduros y ocasiona la pudrición basal del fruto, la cual puede destruir todo el fruto o bien se puede propagar hacia otros frutos que están en contacto con él (Agrios, 1995).

Métodos de control de *Botrytis cinerea*

Durante las últimas décadas en control de este patógeno se ha basado fundamentalmente en el uso desmedido de fungicidas químicos, sin embargo el uso de este método se ha vuelto cada vez menos eficaz debido al desarrollo de cepas con resistencia a estos productos, dado a este problema se han desarrollado nuevas técnicas para el control y la erradicación de este y otros patógenos en poscosecha

entre las cuales destacan el uso de temperatura, CO₂ y la utilización del biopolímero quitosán para el control en post cosecha (Qin *et al.*,2012)

La reciente investigación del uso de las nanopartículas de diferentes productos para el uso como control de la propagación de esta enfermedad es una de las nuevas opciones para la erradicación del hongo en poscosecha. El tomate se considera el producto hortícola de mayor importancia económica en México, por lo tanto, los recubrimientos de diversos tipos incluyendo las NPs pueden ser una opción para controlar y/o prevenir las mermas que se tienen durante la etapa de poscosecha que oscilan entre 11.4 y 14.2%. Estas pérdidas en su mayor parte son debidas al efecto adverso de los agentes patogénicos, principalmente hongos, y en menor proporción a daños mecánicos, lesiones durante el cultivo y efecto adverso por bajas temperaturas (Nuez, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de Estudio

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Agroplasticultura del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, que está ubicado 25°27'36.16" N, 100°58'06.08"O. Este experimento se realizó durante los meses de Octubre a Diciembre del año 2013 y Enero del 2014, se hizo en dos etapas la primera etapa fue *in vitro* y la segunda *in vivo*.

Obtención del material biológico

Para la ejecución del presente estudio tanto para la prueba de *in vitro* como para *in vivo* se utilizó una cepa de *B. cinerea* aportada por el laboratorio de

Agroplasticultura del CIQA y para incrementar el inóculo se siguió el siguiente procedimiento:

Primero se preparó el medio de cultivo, papa dextrosa agar (PDA) en cantidad suficiente para reproducir el hongo *B. cinerea* y tener suficiente material biológico como fuente de inóculo para el desarrollo del estudio. Después, se lavó el material para así preparar el medio de cultivo que se utilizaría; luego se pesó el PDA y se mezcló con agua destilada en matraces de 500 mL; una vez preparado el medio, se puso a esterilizar en autoclave por 15 minutos a 120°C. Ya que transcurrió el tiempo de esterilización, se dejó enfriar el medio para vaciarlo en cajas Petri con aproximadamente 20 mL por caja, se dejó solidificar para posteriormente colocar el explante con el hongo y permitir su desarrollo, para lo que se llevaron a incubar a una cámara para su desarrollo por tres a cuatro días.

Fuente de nanopartículas

Para este estudio se utilizaron nanopartículas de cobre y de óxido de zinc, las nanopartículas de cobre se obtuvieron de dos fuentes diferentes, las primeras se sintetizaron en los laboratorios del CIQA y las otras identificadas con las letras Tx se adquirieron de manera comercial en Sky Spring Nanotecnmaterials INC. Houston, Texas, las nanopartículas de óxido de zinc también se desarrollaron en los laboratorios del CIQA.

Bioensayos *in vitro*

Parámetros de evaluación

En esta fase del estudio, se evaluaron dos parámetros, el primero fue el porcentaje de inhibición del desarrollo del hongo, y el segundo parámetro fue el porcentaje de inhibición de esporulación del hongo. Una vez que el hongo creció y

contamos con suficiente material, se prepararon las nanopartículas objeto de evaluación. Posteriormente, se preparó medio de cultivo (PDA) para evaluar el efecto de las nanopartículas sobre las diferentes variables en el hongo; durante la esterilización, se prepararon las nanopartículas tanto de cobre como de óxido de zinc a concentraciones de 500 y 1000 ppm, para preparar los tratamientos evaluados en este estudio, que se muestran en el Cuadro 1. Estos tratamientos se aplicaron con 5 repeticiones cada uno.

Cuadro 1. Tratamientos a base de nanopartículas de cobre y óxido de zinc evaluados contra *Botrytis cinerea in vitro*.

N°	Sustancia de prueba	Concentración (ppm)
1	Testigo sin aplicación	0
2	NPsCu Tx	1000
3	NPsCu Tx	500
4	NPs Cu	1000
5	NPs Cu	500
6	NPs ZnO	1000
7	NPs ZnO	500
8	NPs Cu + ZnO	250 + 250

Los tratamientos antes citados fueron incorporados al medio de cultivo para su respectiva evaluación. Antes de mezclar las Nanopartículas con el medio de cultivo, se sonicaron para deshacer las partículas y que se mezclaran bien en el agua destilada. Una vez realizado lo anterior se mezcló el medio de cultivo con las nanopartículas y se vaciaron en cajas Petri, se dejó que solidificara el medio y después se puso un explante del hongo en cada una de los tratamientos.

Ya que se inocularon todas las cajas con el hongo, a diferentes concentraciones (Cuadro 1), se llevaron las cajas Petri previamente etiquetada con los tratamientos

respectivos a una incubadora y se dejaron ahí para su desarrollo hasta que el testigo alcanzo más del 90% de la superficie de la caja Petri. Ya que el testigo llenó la caja en donde se inoculó, lo que ocurrió a los 5 días después de la siembra, se midió el diámetro de crecimiento del hongo en todas las unidades experimentales y en este mismo evento se hizo el conteo de esporas sacando un explante de cada unidad experimental, se mezcló en agua destilada, se agitó aproximadamente por 30 segundos, se colocó una muestra en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de esporas con un microscopio compuesto, haciendo las anotaciones correspondientes en la hoja de campo. Con los datos obtenidos se estimó el porcentaje de inhibición de crecimiento y esporulación mediante la ecuación de Abbott.

Bioensayo *in vivo*

Esta fase de estudio se realizó en dos condiciones climáticas diferentes, la primera se realizó en temperatura controlada a 12 °C en una cámara bioclimática y alrededor de 60 % de humedad relativa, la segunda fase se realizó en temperatura ambiente en el laboratorio a un 32 % de humedad relativa y una temperatura máxima de 23 °C. En ambas fases de este estudio *in vivo* se tomaron como parámetros de evaluación los siguientes.

Parámetros de evaluación

En esta segunda etapa del estudio se realizó utilizando frutos de tomate, los parámetros de evaluación para este estudio, se clasificaron en tres apartados, el primero contempla la evaluación de los tratamientos sobre la incidencia y severidad de *B. cinerea*, el segundo son efectos importantes en el fruto como peso, firmeza y grados Brix y en el tercer apartado se evaluó el efecto de los tratamientos sobre algunas propiedades químicas del fruto como licopeno, peroxidasa, catalasa y vitamina C. En esta fase de estudio se utilizaron los tratamientos que se indican en los Cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Tratamientos a base de nanopartículas de cobre y óxido de zinc evaluados contra *Botrytis cinerea* en frutos de tomate en condiciones de temperatura controlada.

Tratamientos	Tipo de Tratamientos	Concentración (ppm)
1	Testigo sin aplicación	0
2	Testigo con explante	0
3	NPs Cu	2000
4	NPs Cu Tx	2000
5	NPs ZnO	2000

Cuadro 3. Tratamientos a base de nanopartículas de cobre y óxido de zinc evaluados contra *Botrytis cinerea* en frutos de tomate en condiciones de temperatura ambiente.

Tratamientos	Tipo de tratamientos	Concentración (ppm)
1	Testigo con explante	0
2	NPs Cu	2000
3	NPs Cu Tx	2000
4	NPs ZnO	2000

Se efectuaron pruebas rociando las nanopartículas a 2000 ppm en frutos de tomate para evaluar el efecto que tienen en el hongo en poscosecha de acuerdo con lo citado en el Cuadro 2 y 3. En cajas de plástico transparente, se cubrió el fondo con papel absorbente, que se mojó con agua destilada para crear una cámara húmeda, después de preparar las cajas en donde se pondrían los tomates, se pesaron los frutos y se lavaron. Una vez lavado los tomates se identificaron por tratamiento, repetición y número de fruto, y se rociaron con los tratamientos (Cuadro 2 y 3) y se dejaron secar, después se pusieron en cada caja tres tomates, a todos los frutos de los diferentes tratamientos excepto el testigo sin explante, se inocularon con un explante con *B. cinerea* en la parte del pedúnculo. Solamente se hizo una aplicación de nanopartículas que fue al iniciar la prueba, después de montar la prueba se dejaron los tomates por siete días, y al séptimo día se evaluó la severidad e incidencia del hongo sobre el fruto, también se tomaron datos de firmeza, grados Brix y peso.

Cuadro 4. Niveles de severidad utilizados para evaluar el daño del hongo *in vivo*.

Nivel de severidad	Daño en el fruto (%)
0	Sin daño
1	10
2	20
3	30
4	40
5	>50

Una vez terminada la evaluación, se limpiaron los frutos y se guardaron en bolsas de plástico transparentes por tratamiento y se guardaron en un congelador a una temperatura de -40°C para su conservación, 30 días después se sacaron los frutos del congelador y se pusieron en agua para que se descongelaran y seguir con las evaluaciones que eran determinar licopeno, catalasa, peroxidasa y vitamina C. Ya que los frutos estaban descongelados se eligió un fruto por cada repetición, se le quitó la cutícula y las semillas, y se maceró en un mortero. Después se pesó la pulpa para cada variable, para peroxidasa se pesó 0.5 gramos, licopeno 2 gramos, catalasa 0.5 gramos y vitamina C 10 gramos, para cada variable se pesaron 32 recipientes con un total de 128 muestras de toda la prueba.

Al terminar de pesar la pulpa e identificar cada muestra, se llevaron al laboratorio para obtener los datos de cada una de las siguientes variables:

Peroxidasa

A los 0.5 gramos de pulpa se le agregó 1 mL de solución buffer a 6.8 pH, se centrifugo a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos, terminados los 10 minutos se extrajo 1 mL del sobrenadante (enzima) y se puso en otro recipiente, se le agrego 2.5 mL de solución buffer y se le agrego 1 mL de pirogalol al 5%, 1 mL de H₂O₂

(Peróxido de hidrógeno) y 1 mL de H₂SO₄ al 5% (Ácido sulfúrico) por último se tomó una muestra y se leyó en el espectrofotómetro a 420 nm (nanómetros).

Licopeno

Después de pesar 2 gramos de pulpa se le agregó 4 mL de una mezcla Hexano-Acetona en relación 3:2, se agitó la mezcla para separar y disolver pigmentos y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, se extrajo la parte coloreada se leyó en el espectrofotómetro a 502 nm.

Catalasa

Una vez que se pesaron 0.5 gramos de pulpa se le agregó 1 mL de solución buffer a 6.8 pH, se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos, después se extrajo 0.5 mL del sobrenadante y se puso en otro recipiente agregándole 2 mL de H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno), 3.5 mL de solución buffer a 6.8 pH, 10 mL de H₂SO₄ (Ácido sulfúrico) y por último titular con 0.01 molar de KMnO₄ (Permanganato de potasio) hasta tomar un color purpura persistente durante 15 segundos.

Vitamina C

A los 10 mg de pulpa pesados se le agregó 5 mL de HCl al 5% (Ácido Clorhídrico) y aforó a 50 mL con agua destilada, posteriormente se filtró con una gasa y se tomaron 10 mL del filtrado, por último se tituló con el reactivo de Thielman hasta que presento un color rosado por 30 segundos.

Análisis estadístico

El presente estudio fue diseñado para analizarse mediante de un diseño experimental completamente al azar para la prueba *in vitro* con el paquete estadístico de la UANL y para la prueba *in vivo* se utilizó el arreglo con dos factores, con los datos obtenidos para cada una de las variables antes citadas se realizó el análisis de varianza (ANVA) en forma independiente para determinar la existencia de diferencias entre

tratamientos; al detectar tal diferencia se aplicó la prueba de comparación de medias por “Tukey” para establecer el orden de eficiencia de los tratamientos con un nivel de significancia del 95%, para esto se utilizó el paquete estadístico XLSTAT 2012. Es importante señalar que los datos en porcentaje fueron antes de su análisis transformados con la función de “raíz cuadrada de $x+1$ ” de acuerdo con (Reyes, 1985), con la finalidad de tener un rango entre datos más bajo y que el coeficiente de variación no fuera tan alto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio se presentan en 3 apartados, el primero comprende el efecto de las nanopartículas sobre *Botrytis cinerea* desde el punto de vista de la incidencia y la severidad del ataque, el segundo apartado trata del efecto de las nanopartículas sobre firmeza, peso y grados Brix del fruto de tomate y el tercero, incluye el efecto de la Nanopartículas sobre algunas características químicas del tomate. Todas estas variables incluyen efectos de los tratamientos respectivos tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *in vivo*.

En el Cuadro 5 se muestran las concentraciones mínima inhibitoria y la máxima fungicida de las NPsCu. Para la obtención de estos datos se inocularon viales de vidrio con capacidad de (9 mL) conteniendo caldo papa dextrosa a diferentes partes por millón de NPs con esporas de *B. cinerea*. Lo anterior se realizó con la finalidad de determinar si hubo o no crecimiento del hongo en el medio de cultivo, habiendo tenido los resultados que se exponen abajo.

Cuadro 5. Tratamientos con NPsCu evaluados y su relación con la concentración mínima inhibitoria y la concentración máxima fungicida de estas nanopartículas.

Tratamientos	Crecimiento del hongo
Testigo	Si
NPsCu 4000	No
NPsCu 2000	No
NPsCu 1000	Solo esporas
NPsCu 500	Si
NPsCu 250	Si

En el Cuadro 5 se explica cuál es la CMI y la CMF en donde la CMI se da que son aplicaciones a 1000 ppm, aunque a 500 ppm el hongo tiene crecimiento en el medio, no alcanza a inhibir el hongo ya que se encontraron esporas, en la aplicación a 1000 ppm solo se encontraron esporas del hongo esto quiere decir que a esa concentración se inhibe el crecimiento del hongo que es lo que se buscaba con esta evaluación, mientras que la aplicación de NPs de cobre a 2000 ppm ya no se encuentra crecimiento ni esporulación en el medio. Por lo tanto se puede decir que la CMI para el hongo *Botrytis cinerea* es de 1000 ppm y la CMF para el hongo es de 2000 ppm *in vitro*

Efecto *in vitro* de nanopartículas contra *Botrytis cinerea*.

En el Cuadro 6 se muestran los efectos de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc sobre el crecimiento y esporulación *in vivo* de *B. cinerea*. En la primer columna se puede observar que en el testigo se obtuvo un mayor crecimiento registrando 64.54 cm de diámetro de la colonia mientras que el tratamiento Cu Tx 1000 y Cu Tx 500 se registró 18.12 y 21.02 cm de diámetro respectivamente, estos son los que tuvieron el mejor efecto en la inhibición del crecimiento con 71.92 y 67.44% de control que están marcados en el Cuadro 6 con la letra “a”. El mezclar Cu y ZnO resulta efectiva porque aun cuando son cantidades mucho más bajas lograron el 53.49% de control, por otra

parte los tratamientos a base de Cu fabricado en el CIQA resultaron menos efectivo que el cobre comercial en cuanto a la inhibición del crecimiento.

Cuadro 6. Efecto de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc sobre el crecimiento y esporulación de *B. cinerea in vitro*.

Tratamientos	CRECIMIENTO		ESPORULACIÓN	
	Diámetro cm	% de Control	Nº de esporas	% de Control
Testigo	64.54	0.00 d	7.40	0.00 c
NPsCu Tx 1000*	18.12	71.92 a	1.60	78.38 ab
NPsCu Tx 500*	21.02	67.44 a	3.80	48.65 b
NPsCu 1000*	31.57	51.08 bc	0.40	94.59 a
NPsCu 500*	63.59	1.48 d	0.00	100.00 a
NPsZnO 1000*	39.15	39.33 c	1.00	86.49 a
NPsZnO 500*	33.40	48.24 bc	2.80	62.16 ab
NPsCu + ZnO 250 + 250*	30.02	53.49 b	3.20	56.76 ab
C.V. %		20.45		37.70

*ppm nivel de significancia = 0.05

Este efecto se puede ver en forma gráfica en la Figura 1 en donde se hace evidente el efecto que tienen las nanopartículas antes descrito.

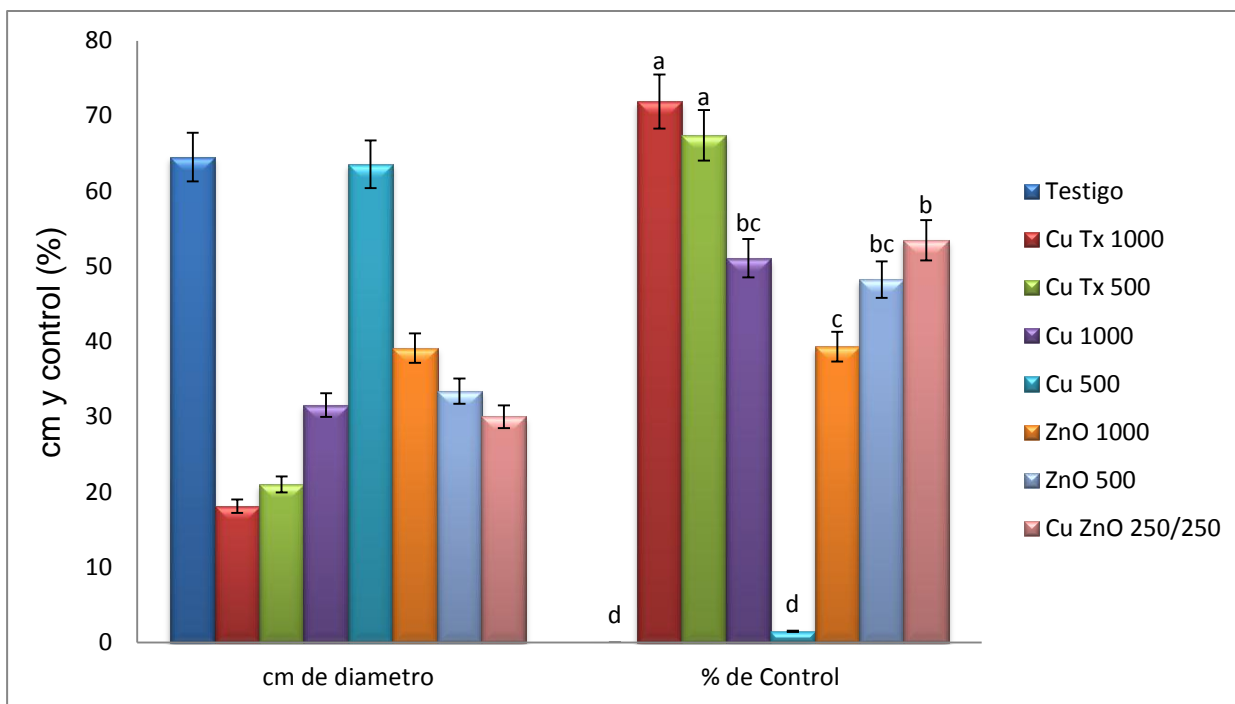


Figura 1. Crecimiento (cm) de *B. cinerea* y porcentaje de control *in vitro* por efecto de la aplicación de nanopartículas de cobre y óxido de zinc. Letras diferentes significan que hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Con respecto al efecto de las nanopartículas en la esporulación *in vivo* de *B. cinerea*, en el mismo Cuadro 6 se puede notar que el testigo registró el mayor nivel de espora por muestra mientras que los tratamientos con Cu sintetizados en el CIQA fueron los que registraron menos esporas con el porcentaje de control de 94.59 y 100% de inhibición, otra cosa que es importante resaltar es el efecto de la mezcla de NPsCu con NPsZnO ya que tuvieron un buen efecto en la inhibición de la esporulación.

Este efecto se puede observar claramente en la Figura 2, en donde se hace evidente el efecto que tienen las nanopartículas de Cu fabricadas en el CIQA teniendo un resultado del 100% de inhibición y el efecto que tuvieron la mezcla de Cu y ZnO a una cantidad más baja que los demás tratamientos teniendo un resultado de 56.76% de inhibición.

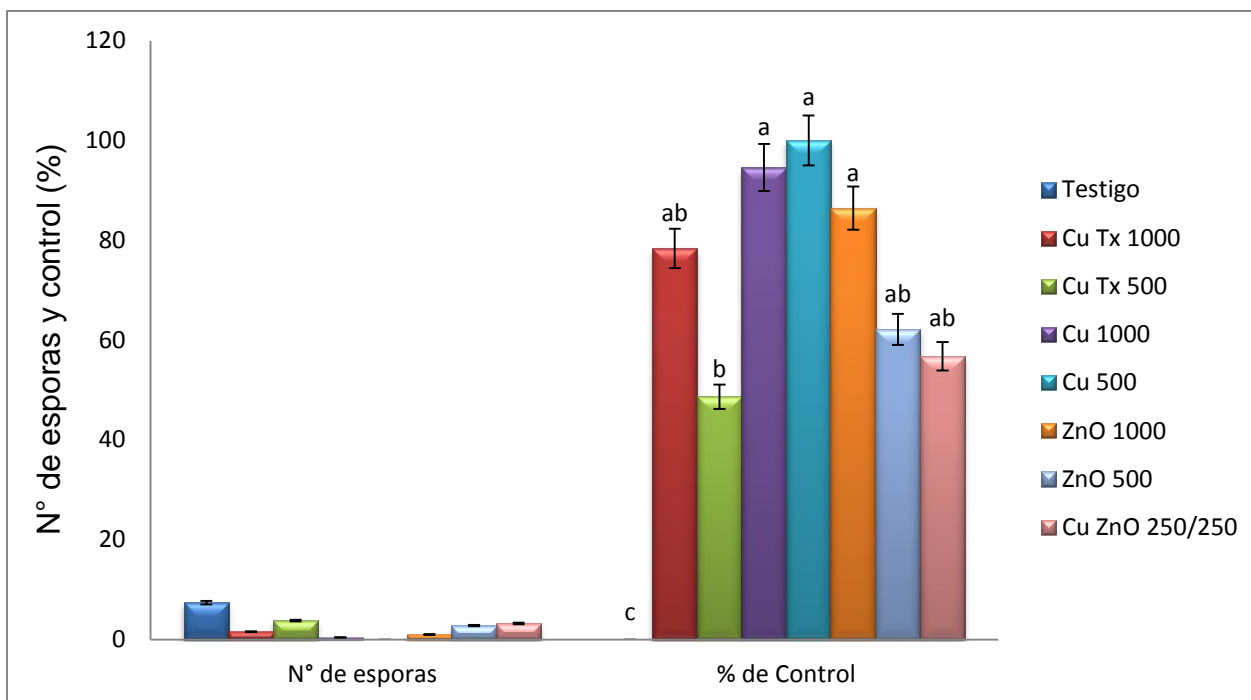


Figura 2. Esporulaci3n *in vitro* de *B. cinerea* y porcentaje de control por efecto de la aplicaci3n de Nanopart3culas de cobre y 3xido de zinc. Letras diferentes significan que hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Incidencia y severidad en condiciones de temperatura controlada

El Cuadro 7 se muestra el porcentaje de control de las NPsCu y 3xido de zinc con base a la incidencia y severidad del hongo en temperatura controlada, en la primera columna se puede observar que el testigo absoluto y el testigo con explante identificados con la letra C tuvieron 50 y 75% de incidencia respectivamente con un porcentaje de control de cero, a pesar que los tratamientos de cobre tanto el fabricado en el CIQA y el comercial tuvieron un porcentaje alto de incidencia, tuvieron mayor porcentaje de control que el testigo, destacando el tratamiento de cobre fabricado en el CIQA con un 50% de efectividad, identificado con las letras AB, sin embargo el mejor tratamiento que se puede observar en el Cuadro fue en el que se utiliz3 3xido de zinc identificado con la letra A, mostrando un 16.66% de incidencia con un 75% de control sobre el hongo.

En este mismo Cuadro se muestran los niveles de severidad y el porcentaje de control que se observaron en el estudio realizado in vivo en condiciones de temperatura controlada, se puede apreciar que todos los tratamientos tuvieron un nivel bajo de severidad según la escala del Cuadro 4, pero al igual que en la incidencia el tratamiento que tuvo un porcentaje mayor de control fue el tratamiento en el que se utilizaron nanopartículas de óxido de zinc con un 75% de efectividad, que se identifica con la letra A, siguiéndole los tratamientos de cobre con 37.50% de control cada uno.

Lo antes mencionado se puede apreciar gráficamente en la Figura 3, como el mejor tratamiento tanto para incidencia y severidad del hongo fue el tratamiento en el que se usaron las nanopartículas de óxido de zinc, siguiendo el tratamiento con Nanopartículas de cobre fabricadas en el CIQA.

Cuadro 7. Efecto de las Nanopartículas de cobre y óxido de zinc sobre la incidencia y severidad de *B. cinerea* in vivo en temperatura controlada.

Tratamientos	Temperatura Controlada			
	Incidencia		Severidad	
	%	% de Control	0-5	% de Control
Test. Absoluto	50.00	0.00 c	0.750	0.00 b
Test. Explante	75.00	0.00 c	1.167	12.50 b
NPsCu	41.66	50.00 ab	0.667	37.50 ab
NPsCu Tx	50.00	25.00 bc	0.667	37.50 ab
NPsZnO	16.66	75.00 a	0.250	75.00 a
C.V.%		67.18		76.16

Nivel de significancia $P \leq 0.05$

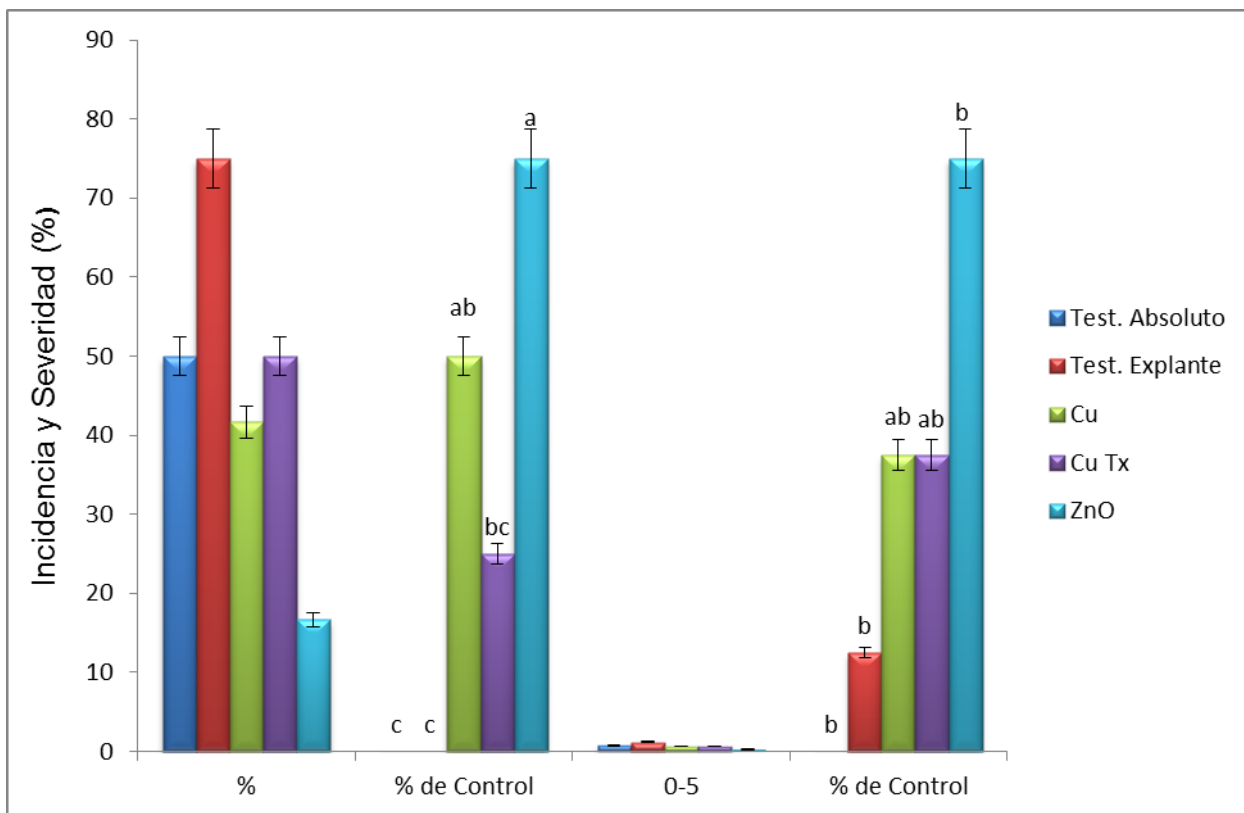


Figura 3. Incidencia y severidad *in vivo* de *B. cinerea* sobre el fruto de tomate y porcentaje de control del mismo, en condiciones de almacenamiento en temperatura controlada. Letras diferentes significan que hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Incidencia y severidad en condiciones de temperatura ambiente.

En el Cuadro 8 se muestran los resultados de la evaluación de la incidencia y de la severidad de *B. cinerea* *in vivo* en condiciones de temperatura ambiente, tal y como se muestra en el Cuadro los tratamientos no tuvieron una diferencia significativa, todos arrojaron datos de incidencia mayores al 70%, teniendo un 100% de incidencia el tratamiento en donde se utilizaron nanopartículas de cobre comercial, también se puede observar que tuvieron muy bajo porcentaje de control, casi nulo, a diferencia de los datos obtenidos en las muestras a temperatura controlada. En la columna de severidad la mayoría de los tratamientos obtuvieron una severidad arriba del nivel dos, siendo el

tratamiento con nanopartículas de cobre fabricadas en el CIQA el que tuvo un mejor porcentaje de control con 48.21%.

Cuadro 8. Efecto de las nanopartículas de cobre y óxido de zinc sobre la incidencia y severidad de *B. cinerea* en temperatura ambiente.

Tratamientos	Temperatura Ambiente			
	Incidencia		Severidad	
	%	% de Control	0-5	% de Control
Testigo	77.77	0.00 a	2.11	0.00 a
NPsCu	77.77	22.22 a	1.00	48.21 a
NPsCu Tx	100.00	0.00 a	2.33	14.28 a
NPsZnO	88.88	11.11 a	2.11	13.09 a

En la Figura 4 se pueden apreciar gráficamente los resultados de lo antes mencionado del Cuadro 8.

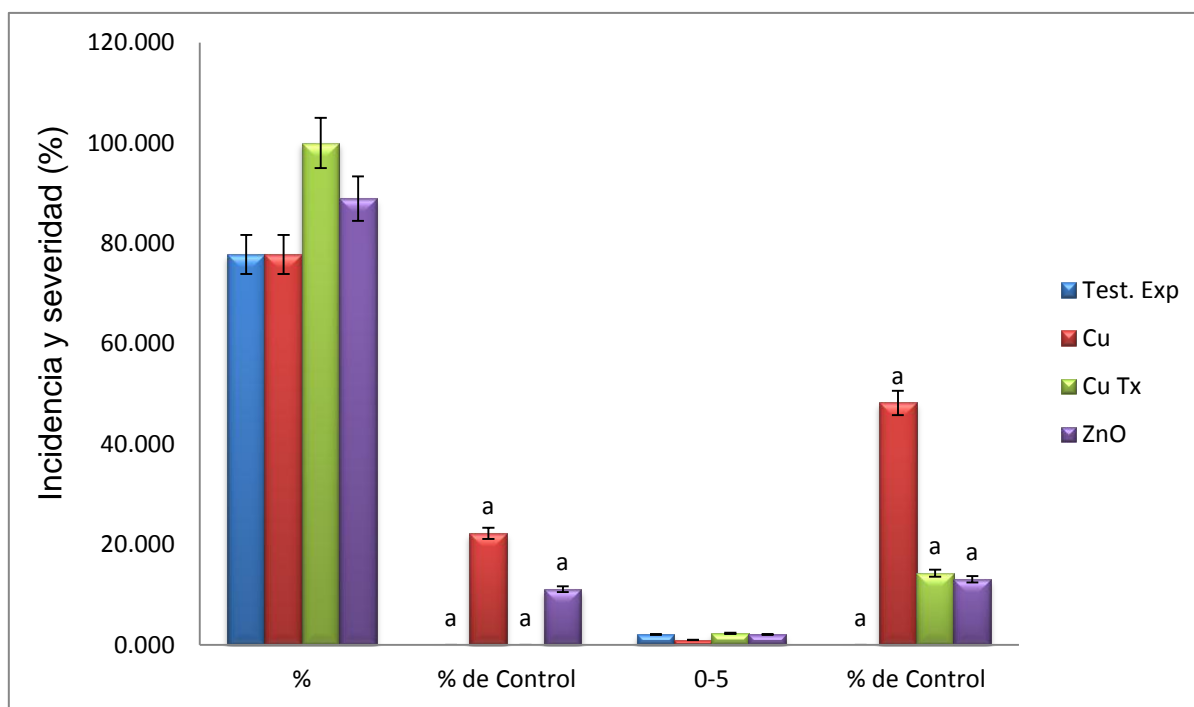


Figura 4. Incidencia y severidad de *B. cinerea* sobre el fruto de tomate y porcentaje de control del mismo en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 5 se muestra el efecto de la aplicación de tres tipos de nanopartículas en dos condiciones de almacenamiento sobre el nivel de severidad de *B. cinerea*; en temperatura controlada se observa que el tratamiento que expresó mayor nivel de severidad fue el testigo con explante, seguido por los tratamientos con NPsCu y el que registró menor severidad fue el tratamiento con NPsZnO. Por otro lado en temperatura ambiente, el tratamiento con mayor nivel de severidad fue el de NPsCu Tx, seguido por el testigo con explante y NPs ZnO, el que mostró menor nivel de severidad es el tratamiento con NPsCu. Con base en los resultados antes descritos es claro que el ambiente juega un papel determinante en el efecto de los tratamientos evaluados sobre *B. cinerea*, mostrando en general un mejor efecto en condiciones de temperatura controlada. Esta tendencia se observa en forma gráfica en la Figura 5.

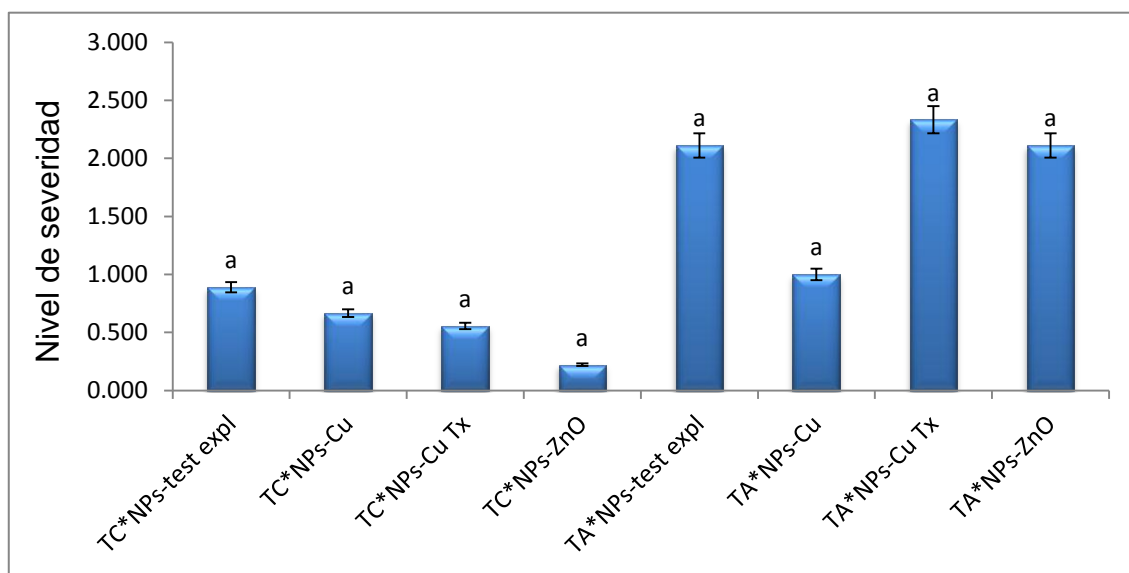


Figura 5. Nivel de severidad de *Botrytis cinerea* en el fruto del tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

El porcentaje de incidencia de *B. cinerea* en los frutos de tomate como efecto de los tratamientos a base de tres nanopartículas en dos condiciones de almacenamiento se muestra en la Figura 6. En temperatura controlada se observa que el testigo con explante y el tratamiento a base de NPsZnO son los que registraron menor porcentaje de incidencia es decir que en este tratamiento seguido por los tratamientos con NPsCu. Los tratamientos evaluados en temperatura ambiente mostraron mayor porcentaje de incidencia siendo el tratamiento con NPSCu Tx el más alto, seguido por el tratamiento con NPsZnO y NPsCu respectivamente, y por último el testigo fue el que tuvo menor porcentaje de incidencia.

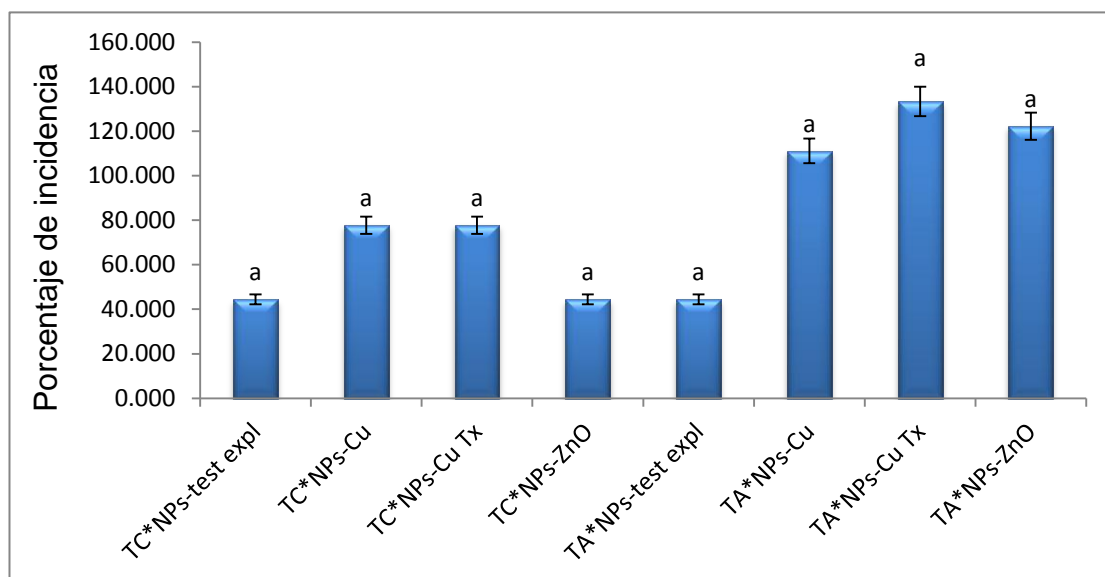


Figura 6. Efecto de la temperatura y las nanopartículas en el porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en el fruto del tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Peso final, firmeza y grados Brix de frutos de tomate

En las siguientes graficas se muestra el efecto que tuvieron las Nanopartículas, la temperatura y la combinación de temperatura y nanopartículas sobre el fruto en peso final, firmeza y grados brix.

En la Figura 7 se muestra el efecto de la aplicación de tres tipos de Nanopartículas sobre el peso de los frutos entre los tratamientos utilizados 7 días después de haberlas aplicado, en la gráfica se aprecia que el tratamiento con NPsCu Tx fue el tratamiento que registró menor peso de frutos con promedio 91.27 g, coincidiendo esto con los datos mostrados en la Figura 6 y 5, donde se observa que este tratamiento fue el que mostró mayor porcentaje de incidencia y mayor nivel de severidad. Mientras que el tratamiento con NPsZnO tuvo menor pérdida de peso.

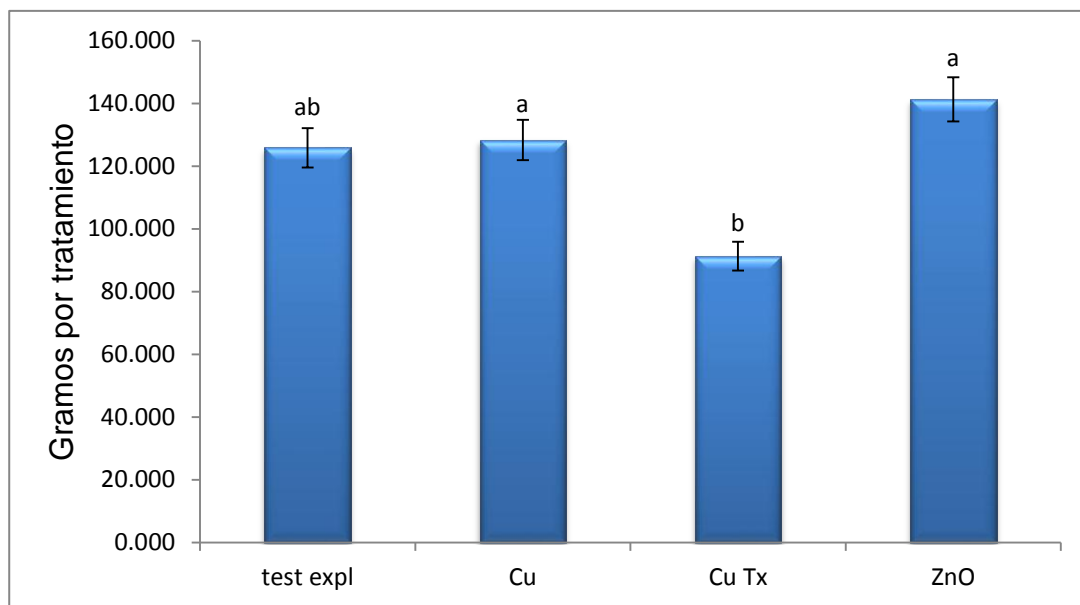


Figura 7. Peso de los frutos 7 días después por efecto de tres tipos de nanopartículas. Letras diferentes significan que hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En cuanto a la firmeza de los frutos a 7 días después de la aplicación de los tratamientos, en la Figura 8 se muestra que en ninguno de los tratamientos se observa diferencia estadística, sin embargo si existe diferencia numérica así, los tratamientos de NPsCu y NPsZnO los que registraron mayor firmeza con valores de 0.681 Kg/cm² cada uno, en contraste con el testigo que mostró un valor de 0.583 Kg/cm².

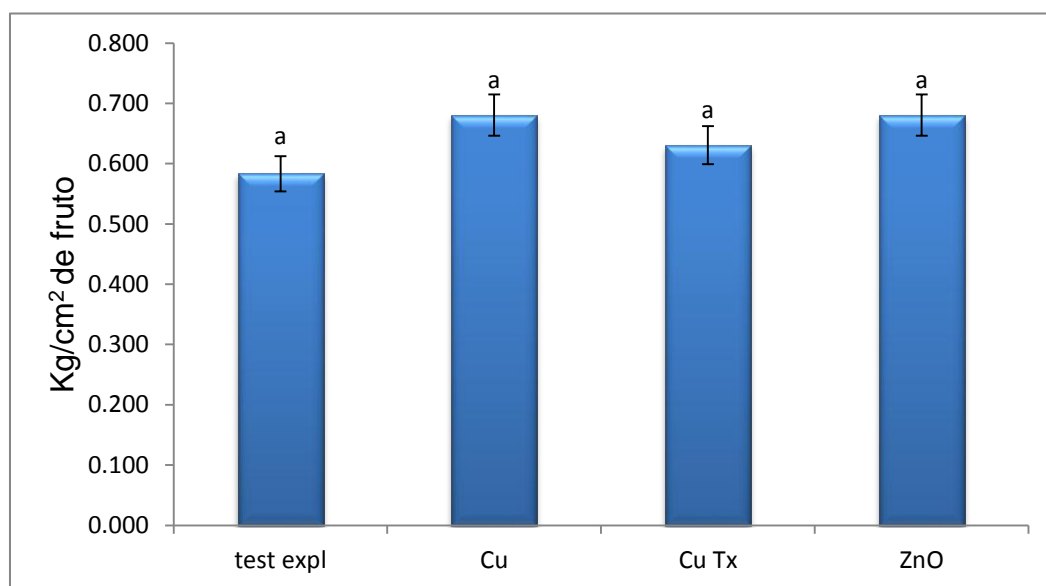


Figura 8. Firmeza del fruto del tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos por el efecto de los tres tipos de NPs evaluadas, sobre la concentración de grados Brix en los frutos. En este gráfico no se aprecia diferencia estadística entre tratamientos, pero si una clara diferencia numérica, ya que el tratamiento con NPsCu comercial, fue el que generó mayor concentración de grados Brix, seguido por los demás tratamientos, siendo el testigo el que mostró menor concentración de grados Brix; los datos mostrados en esta grafica nos indican que la aplicación de los tres tipos de nanopartículas no tiene efecto negativo en la concentración de grados Brix en comparación con el testigo evaluado.

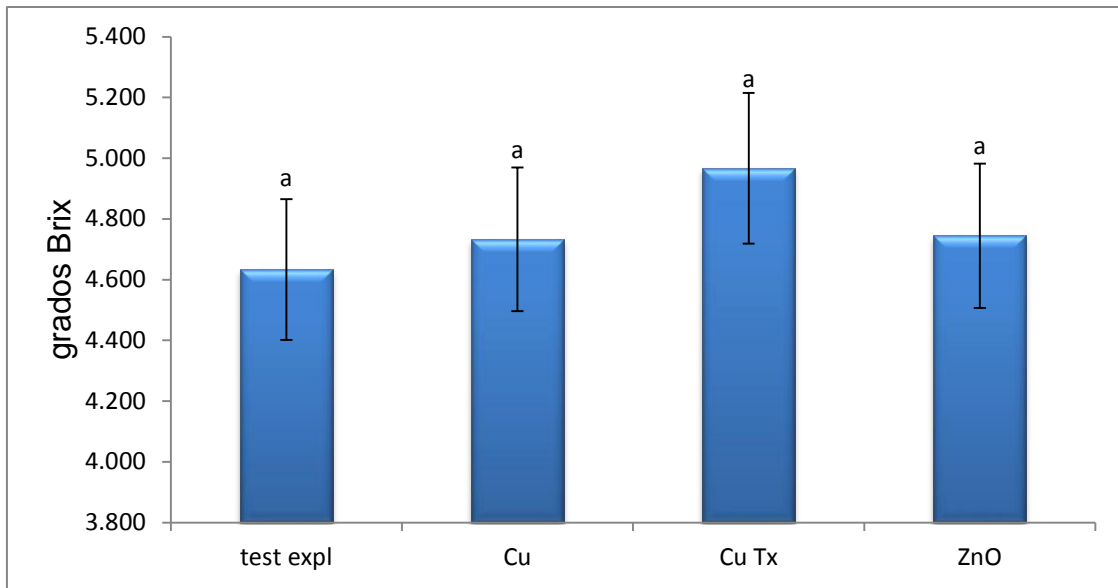


Figura 9. Concentración de grados Brix en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Efecto de la temperatura sobre el fruto del tomate

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos por el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la concentración de grados Brix, Diferencia de peso del fruto y el porcentaje de severidad de *B. cinerea*. En este gráfico no se aprecia diferencia estadística, pero si se observa una diferencia numérica, ya que entre las variables como lo es en la diferencia de peso se aprecia que en la temperatura controlada (12°C) hubo mayor diferencia peso que en la temperatura ambiente (23°C), esto quiere decir que los frutos evaluados mostraron mayor pérdida de peso en condiciones de temperatura controlada que en condiciones de temperatura ambiente. En cuanto a la severidad se aprecia que en condiciones de temperatura ambiente hubo mayor porcentaje de severidad que en condiciones de temperatura controlada, es decir que en condiciones de temperatura controlada existe menor desarrollo de *B. cinerea*. En grados Brix mostró muy poca diferencia siendo los

tratamientos evaluados en temperatura ambiente los que revelaron mayor concentración de grados Brix.

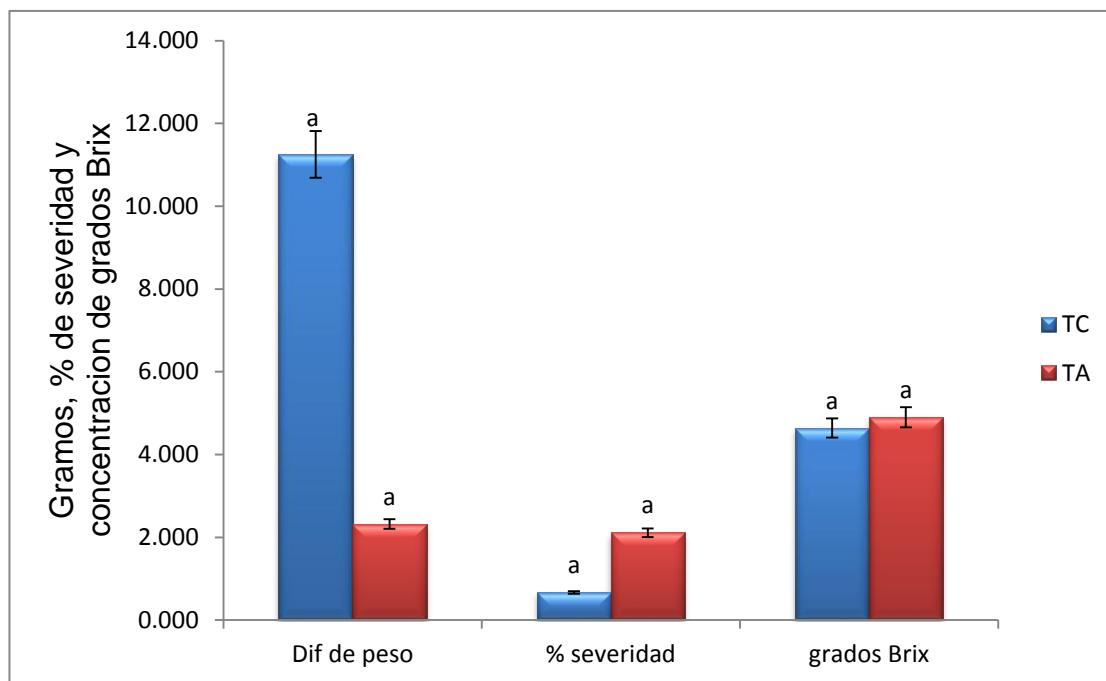


Figura 10. Diferencia de peso, % de severidad y concentración de grados Brix en los frutos por el efecto temperatura ambiente y temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Efecto de la temperatura y nanopartículas en características del fruto

En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos por el efecto de los tres tipos de NPs evaluadas, así como el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre el peso 7 días después de la aplicación de las nanopartículas en los frutos en condiciones de temperatura ambiente (23 °C) y temperatura controlada (12 °C). En este gráfico se aprecia diferencia estadística entre tratamientos evaluados en temperatura controlada y solo en condición de temperatura ambiente el testigo con explante es el único que mostro variación en el peso, esto quiere decir que las

nanopartículas que se evaluaron en condiciones de temperatura controlada hubo más variación que en los tratamientos en donde se evaluaron en condiciones a temperatura ambiente.

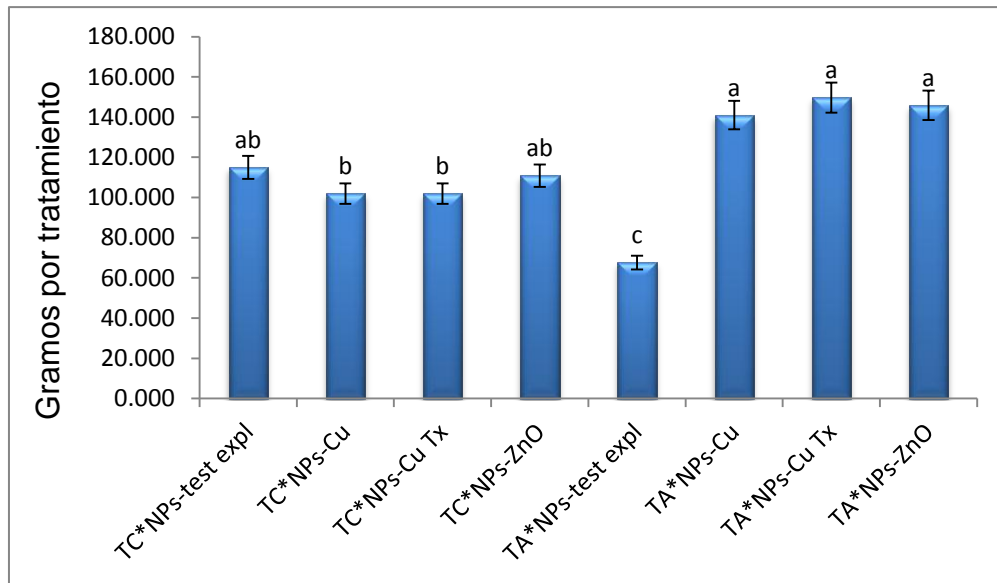


Figura 11. Diferencia de pesos de los frutos 7 días después por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras diferentes significan que hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 12 se expresan los resultados que se obtuvieron por el efecto de los tres tipos de NPs evaluadas, así como el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la firmeza en los frutos en condiciones de temperatura ambiente y temperatura controlada. En este gráfico no se aprecia diferencia estadística entre tratamientos, pero si una notoria diferencia numérica, ya que el tratamiento con NPsZnO en condiciones de temperatura controlada, fue el que mostro mayor firmeza con 0.733 Kg/cm^2 , mientras que en los tratamientos evaluados en condiciones de temperatura ambiente el que mostró mayor firmeza fue el testigo con explante (0.750 kg/cm^2) seguido por el tratamiento con NPsCu Tx (0.733 kg/cm^2),

teniendo como resultado según lo que muestra la gráfica que en condiciones de temperatura controlada los frutos tienen menos firmeza que en temperatura ambiente.

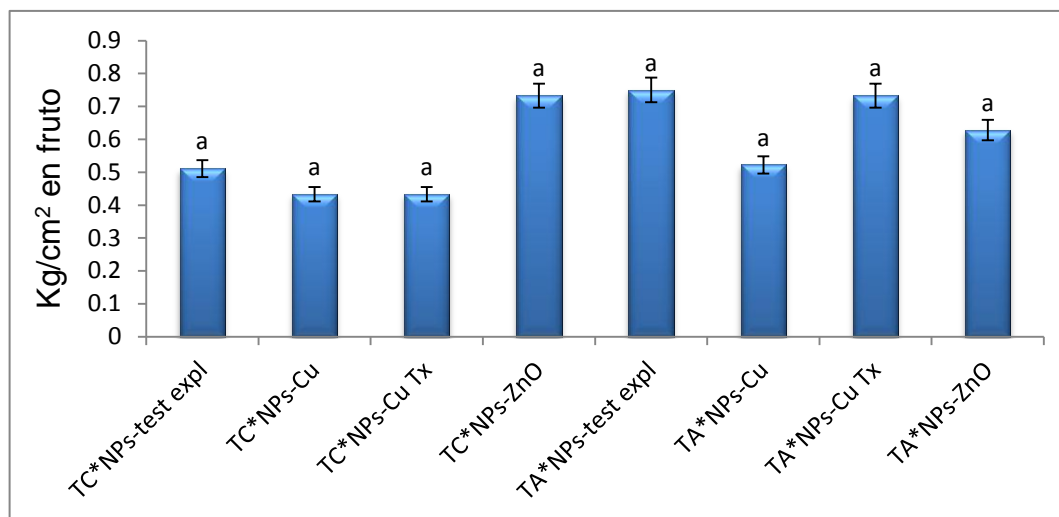


Figura 12. Firmeza del fruto de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos por el efecto de los tres tipos de NPs evaluadas, así como el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la concentración de grados Brix en los frutos en condiciones de temperatura ambiente y temperatura controlada. En este gráfico no se aprecia diferencia estadística entre tratamientos, y solo una diferencia numérica pequeña entre los tratamientos en donde el que mostró mayor concentración de grados brix fue el tratamiento con NPs-Cu Tx en condiciones de temperatura ambiente con 5.033° Brix

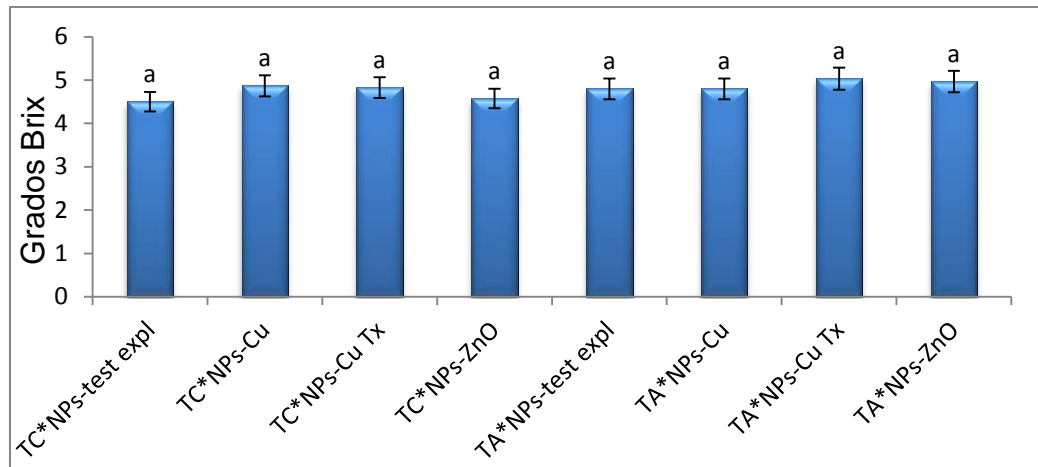


Figura 13. Concentración de grados Brix en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Efecto de la temperatura, nanopartículas y temperatura mas nanopartículas en componentes químicos del fruto del tomate.

Efecto de la temperatura en el fruto.

En la Figura 14 se aprecian los resultados obtenidos por el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la concentración peroxidasa en los frutos en condiciones de temperatura ambiente (23 °C) y temperatura controlada (12 °C). En este gráfico no se muestra diferencia estadística entre las condiciones, pero si una clara diferencia numérica, ya que los tratamientos que fueron evaluados en temperatura ambiente, fueron los que generaron mayor concentración de peroxidasa con un valor de 21.910 unidades por minuto por gramo, mostrando estos resultados se puede decir que en condiciones de temperatura se concentra más los niveles de peroxidasa.

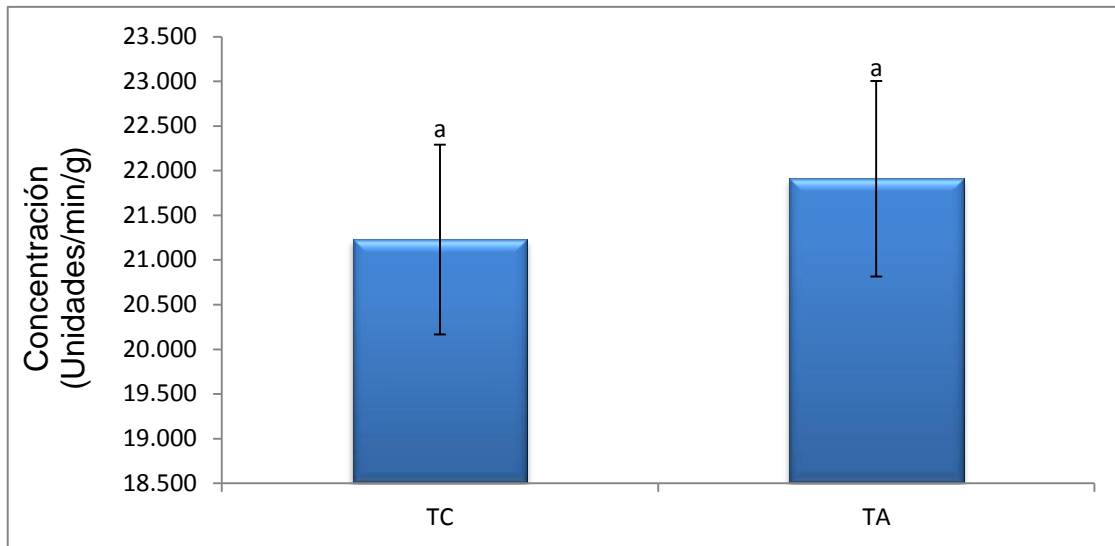


Figura 14. Concentración de la enzima peroxidasa en pulpa de tomate por efecto del almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Al igual que en la Figura anterior, en la Figura 15 se pueden observar los resultados obtenidos por el efecto de los tres tipos de NPs evaluadas, así como el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la concentración catalasa en los frutos en condiciones de temperatura ambiente y temperatura controlada. En este gráfico no se muestra diferencia estadística entre las condiciones en donde se evaluaron los tratamientos, pero si una clara diferencia numérica, ya que al igual que en los resultados obtenidos para la concentración de peroxidasa, en esta Figura la temperatura ambiente fue la que registró mayor concentración de la enzima catalasa.

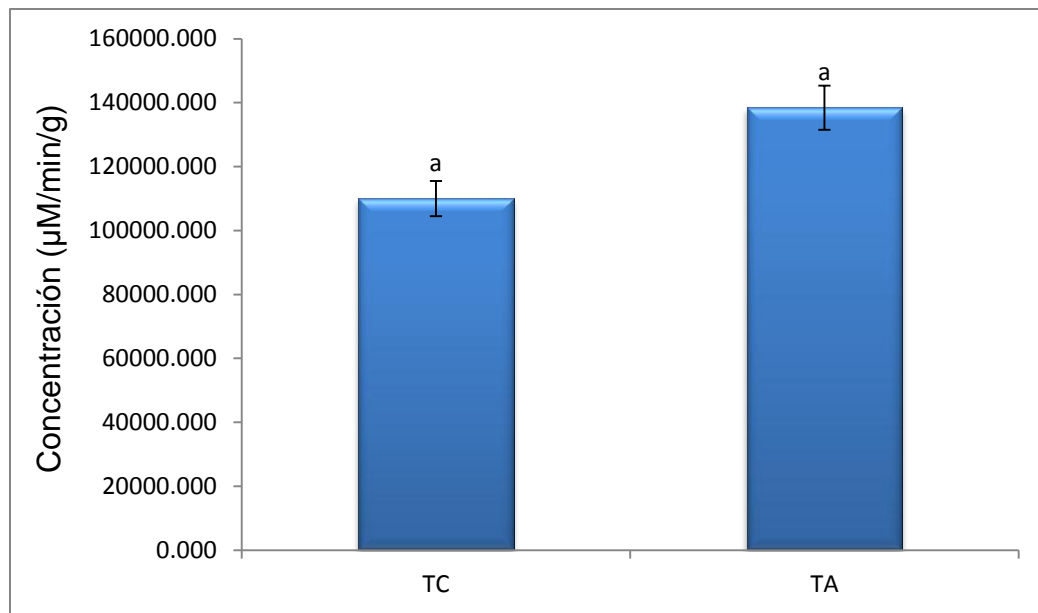


Figura 15. Concentración de la enzima catalasa en pulpa de tomate por efecto de su almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

A continuación, en la Figura 16 se muestran los resultados que se obtuvieron por el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la concentración de la enzima licopeno, en temperatura controlada y temperatura ambiente. En este gráfico se muestra la diferencia estadística entre las dos condiciones, se puede observar que los tratamientos que se evaluaron en condiciones de temperatura ambiente se obtuvieron 16.758 $\mu\text{g/g}$, a diferencia de la temperatura controlada que registró 10.581 $\mu\text{g/g}$. lo cual muestra claramente que la concentración de licopeno es afectada a las condiciones climáticas a la que fueron expuestos los frutos.

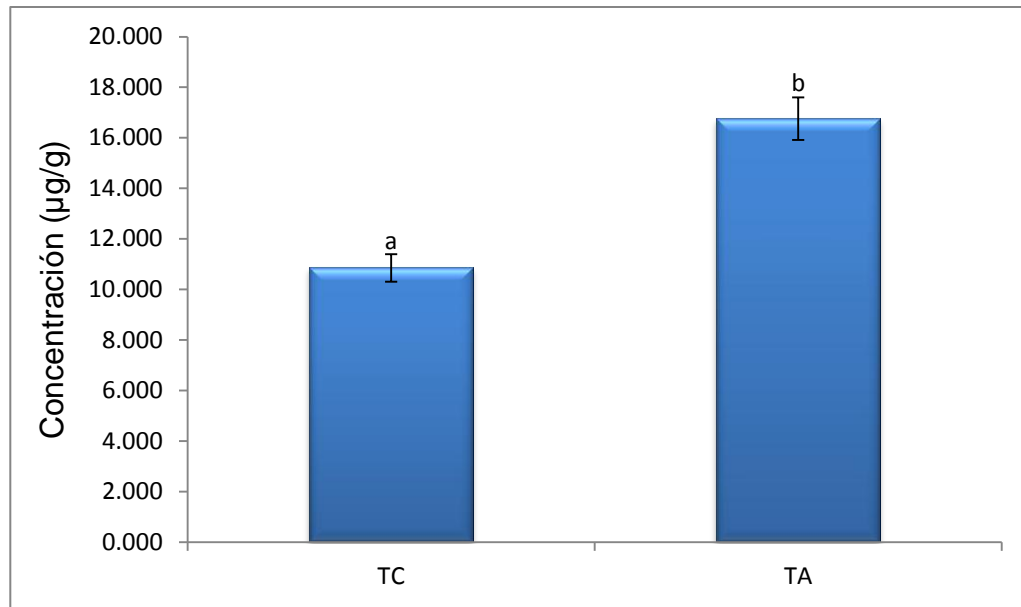


Figura 16. Concentración del pigmento licopeno en pulpa de tomate por efecto de su almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras diferentes significan que hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

La concentración de vitamina C como efecto a la evaluación de dos condiciones de almacenamiento de fruto, mostró que no hay una diferencia estadística, pero si existe diferencia numérica en donde se registró que los tratamientos evaluados en temperatura ambiente tuvieron mayor concentración que los tratamientos en temperatura controlada, registrando 4.803 mg/100g de fruto y 4.693 mg/100g de fruto respectivamente. Por lo tanto según los datos arrojados por la evaluación de estas condiciones se puede concluir que la diferencia de temperaturas tiene impacto en la concentración de vitamina C de los frutos siendo la más favorable la temperatura ambiente (23°C), esto se puede observar en los datos graficados en la Figura 17.

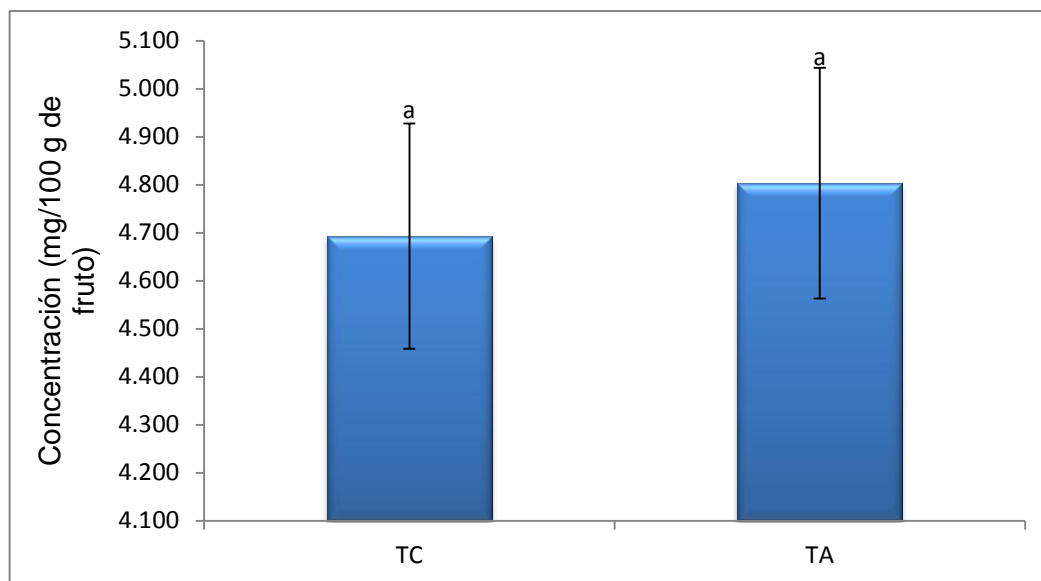


Figura 17. Concentración de la vitamina C en pulpa de tomate por efecto de su almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Efecto de las nanopartículas en propiedades químicas del fruto.

En la Figura 18 se muestra la evaluación del efecto en la concentración de la enzima peroxidasa por la aplicación de tres tipos de nanopartículas, en donde no se aprecia diferencia estadística, pero se puede observar que entre los tratamientos hay diferencia numérica en donde el tratamiento con NPsCu registró mayor concentración de peroxidasa (27.640 unidades/min/g), seguido por los tratamientos de NPsCu Tx (19.940 unidades/min/g) y NPsZnO (22.840 unidades/min/g). En la literatura no se encuentran trabajos relacionados con el efecto en la concentración de la enzima peroxidasa de la aplicación de nanopartículas en frutos de tomate, sin embargo mencionada por Salarpour *et al.* (2013), describe que el uso de nanoquelatos de hierro en berro, tienen un efecto significativo en la concentración de la enzima peroxidasa, teniendo como concentración máxima 0.31 unidades/min/g, concentración mayor a la obtenida en el tratamiento testigo.

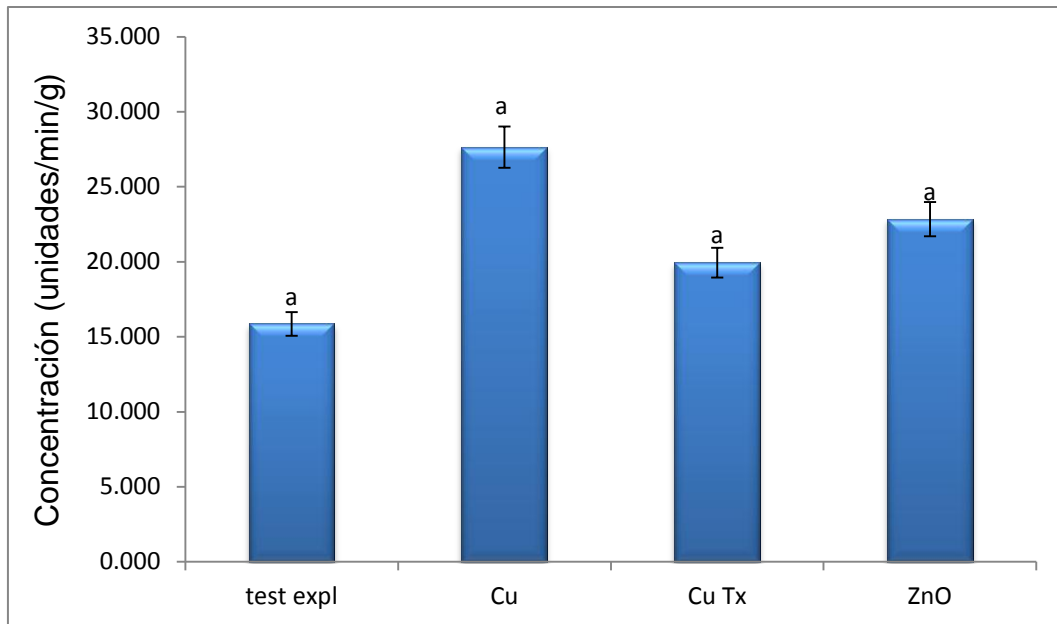


Figura 18. Concentración de peroxidasa en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

La Figura 19, muestra la evaluación del efecto en la concentración de la enzima catalasa por la aplicación de tres tipos de nanopartículas en frutos de tomate, no se mostró diferencia estadística entre los tratamientos, pero si se observa diferencia numérica en donde el tratamiento que registró mayor concentración de catalasa fue el testigo con explante ($141,252 \mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$), seguido por el tratamiento con NPsZnO ($138,408 \mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$). No se encuentra literatura que mencione el efecto en la concentración de catalasa de los frutos por la aplicación de nanopartículas, pero en este apartado se puede concluir que no hay un efecto significativo al haber aplicado los tres tipos de nanopartículas.

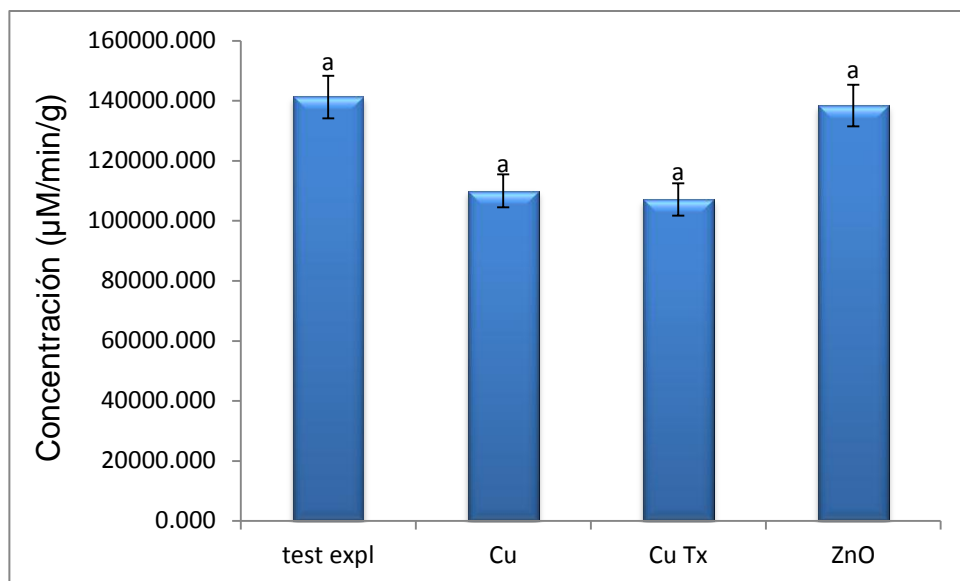


Figura 19. Concentración de catalasa en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 20 se muestra la evaluación del efecto en la concentración de licopeno por la aplicación de tres tipos de NPs, en donde no se aprecia diferencia estadística, pero se puede observar que entre los tratamientos hay diferencia numérica en donde el tratamiento con NPs Cu comercial registró mayor concentración de licopeno (14.914 µg/g), seguido por el tratamiento de NPs Cu (14.537 µg/g). En la literatura no se encuentran trabajos relacionados con el efecto en la concentración de licopeno por la aplicación de nanopartículas en frutos de tomate, sin embargo en este apartado se puede observar que el uso de NPs no tiene efecto negativo en la concentración de licopeno en el fruto.

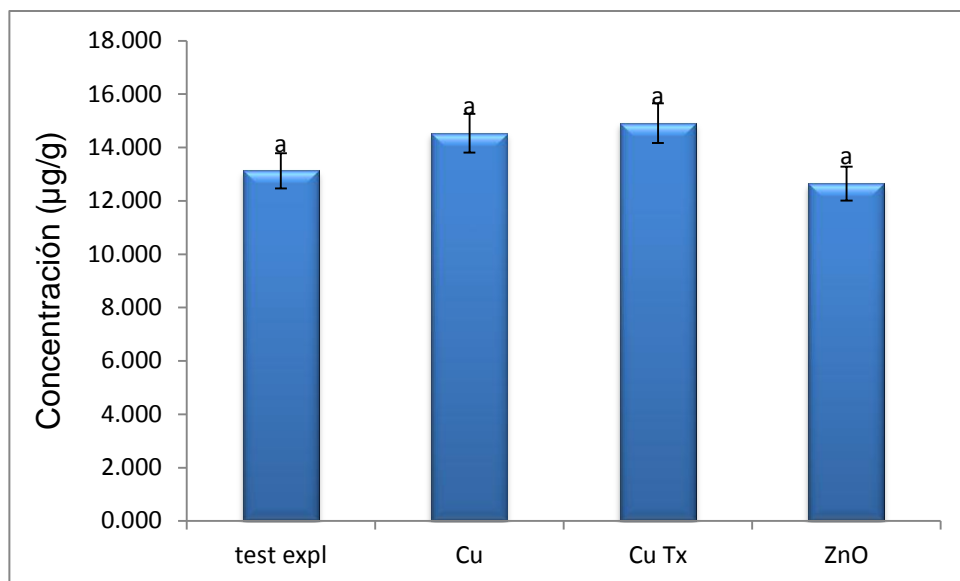


Figura 20. Concentración de licopeno en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 21 se muestra la evaluación del efecto en la concentración de la vitamina C por la aplicación de tres tipos de nanopartículas, en donde no se aprecia diferencia estadística, pero se puede observar que entre los tratamientos existe una mínima diferencia numérica en donde el tratamiento con NPsCu registró mayor concentración de vitamina C (4.98 mg/100g de fruto), seguido por los tratamientos de NPsCu Tx (4.76mg/ 100 g de fruto) y NPsZnO (4.69mg/100 g de fruto). En la literatura no se encuentran trabajos relacionados con el efecto en la concentración de la vitamina C de la aplicación de NPs en frutos de tomate, sin embargo la gráfica muestra que al aplicar nanopartículas la concentración de vitamina C registra mayor nivel a comparación de los frutos no tratados.

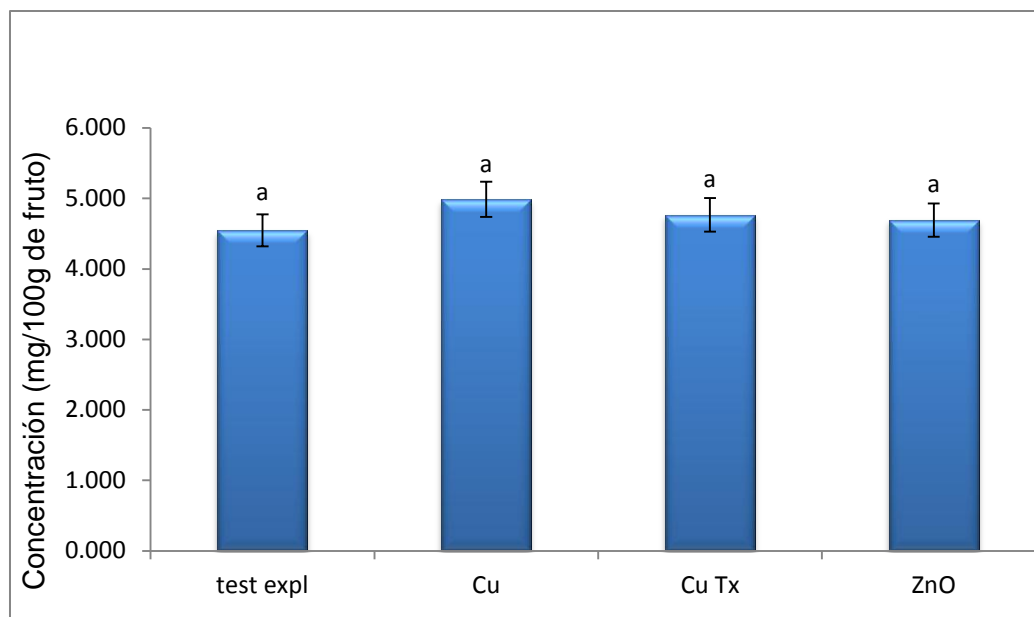


Figura 21. Concentración de la vitamina C en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Efectos de la temperatura y de las nanopartículas en el fruto del tomate

En la Figura 22 se muestra la evaluación del efecto en la concentración de la enzima peroxidasa por la aplicación de tres tipos de nanopartículas en dos condiciones de almacenamiento en temperatura controlada (12 °C) y temperatura ambiente (23 °C), en donde no se aprecia diferencia estadística entre los tratamientos, pero se observa que entre los tratamientos hay diferencia numérica en donde el tratamiento con NPsCu en condiciones de temperatura ambiente registró mayor concentración de peroxidasa (32.200 unidades/min/g), seguido por NPsZnO (22.840 unidades/min/g). La literatura no menciona el efecto que tienen estas condiciones y la aplicación de NPs sobre la enzima peroxidasa, aun así en la gráfica se muestra que todos los tratamientos registraron mayor concentración que los testigos con explantes, siendo los frutos tratados en

condiciones de temperatura controlada los que mostraron menor variación entre tratamientos con NPs.

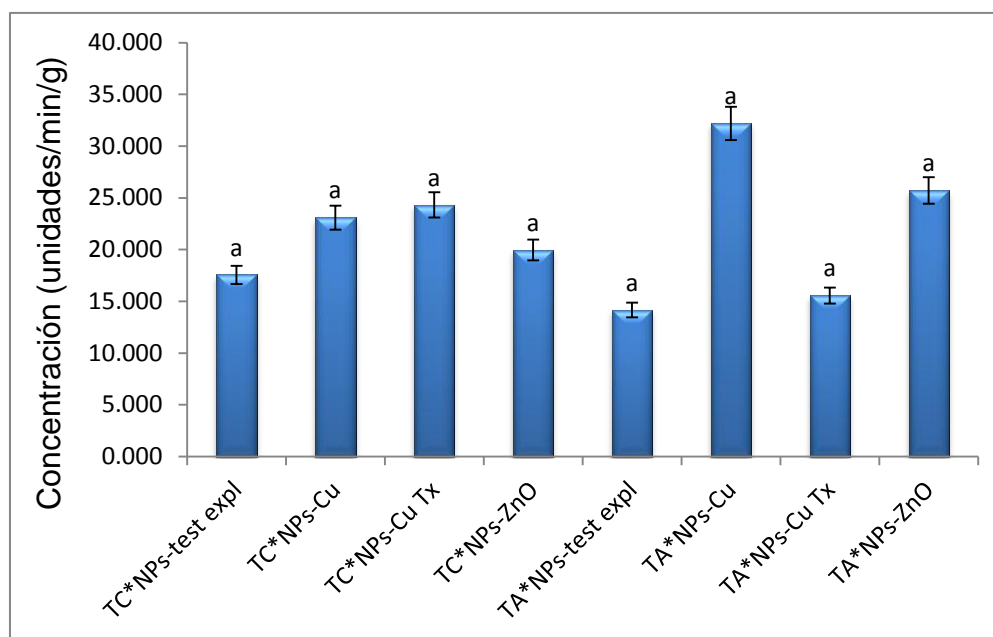


Figura 22. Concentración de la enzima peroxidasa en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 23 se muestra la evaluación del efecto en la concentración de la enzima catalasa por la aplicación de tres tipos de nanopartículas en dos condiciones de almacenamiento en temperatura controlada (12 °C) y temperatura ambiente (23 °C), en donde no se aprecia diferencia estadística entre los tratamientos, pero se observa que entre los tratamientos hay diferencia numérica, el tratamiento testigo en condiciones de temperatura ambiente registró mayor concentración de catalasa (166848 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$), seguido por NPsZnO (151680 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$). La literatura no menciona el efecto que tienen estas condiciones y la aplicación de NPs sobre la enzima catalasa, aun así en la Figura 23 se muestra que los tratamientos en donde se aplicaron las NPs registraron valores menores al testigo

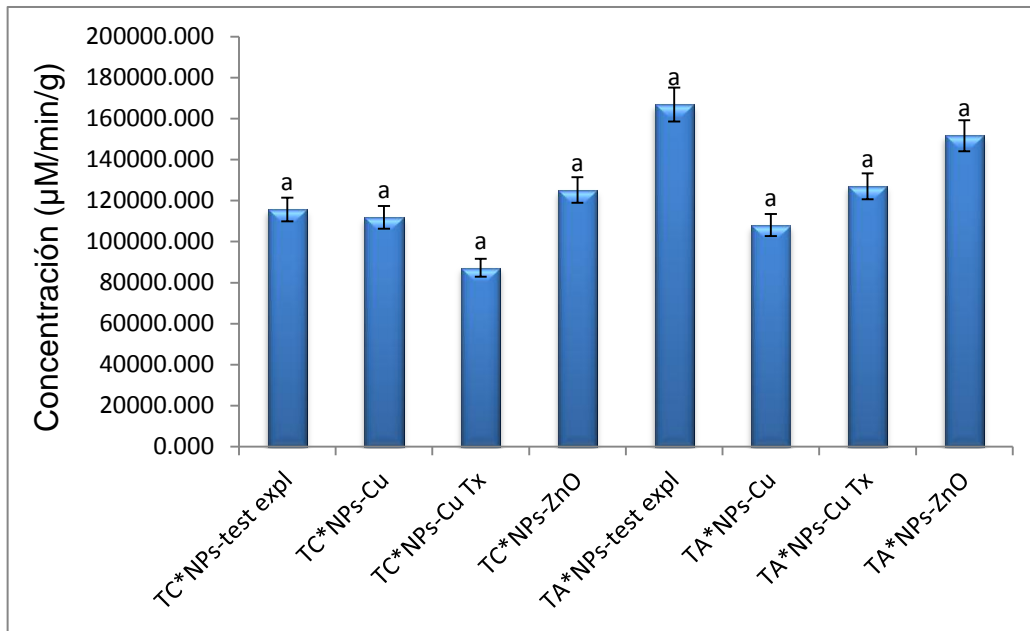


Figura 23. Concentración de catalasa en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos por el efecto de los tres tipos de NPs evaluadas, así como el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la concentración de licopeno en los frutos en condiciones de temperatura ambiente (23 °C) y temperatura controlada (12 °C). En este gráfico no se aprecia diferencia estadística entre tratamientos, pero sí una clara diferencia numérica, ya que el tratamiento con NPs Cu comercial en condiciones de temperatura ambiente, fue el que generó mayor concentración de licopeno, seguido por los demás tratamientos en las mismas condiciones, mientras que en el ambiente de temperatura controlada las NPs ZnO, reportaron mayor concentración de esta enzima. La literatura no reporta resultados sobre la concentración de licopeno en frutos de tomate por efecto de la aplicación de nanopartículas en ellos; sin embargo, Ranveer *et al.* (2013) encontraron que la concentración de esta enzima varió significativamente en función de donde se extrajo el licopeno ya que en la cascara de tomate encontraron la mayor concentración

(417.97 $\mu\text{g/g}$) seguido por el desecho industrial (195.74 $\mu\text{g/g}$), el tomate completo (83.85 $\mu\text{g/g}$) y la pulpa con 47.6 $\mu\text{g/g}$.

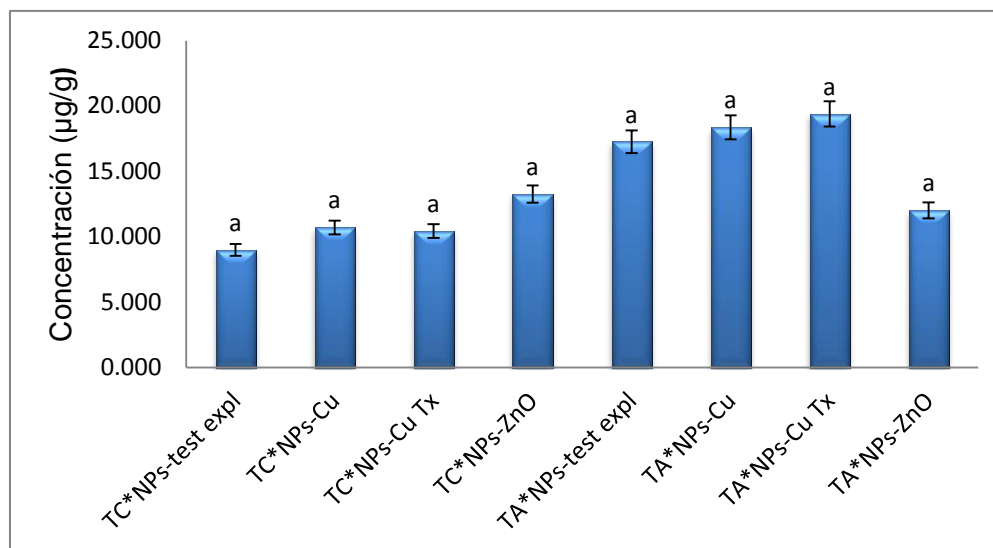


Figura 24. Concentración del pigmento licopeno en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos por el efecto de los tres tipos de NPs evaluadas, así como el efecto de dos condiciones de almacenamiento de frutos de tomate sobre la concentración de vitamina C en los frutos en condiciones de temperatura ambiente (23 °C) y temperatura controlada (12 °C). En este gráfico no se aprecia diferencia estadística entre tratamientos, pero sí una clara diferencia numérica, ya que el tratamiento con NPs Cu comercial en condiciones de temperatura controlada, fue el que generó mayor concentración de vitamina C, seguido por los demás tratamientos en las mismas condiciones, mientras que en el ambiente de temperatura controlada las NPs Cu comercial, reportaron mayor concentración de esta vitamina. La literatura no reporta resultados sobre la concentración de vitamina C en frutos de tomate por efecto de la aplicación de nanopartículas en ellos.

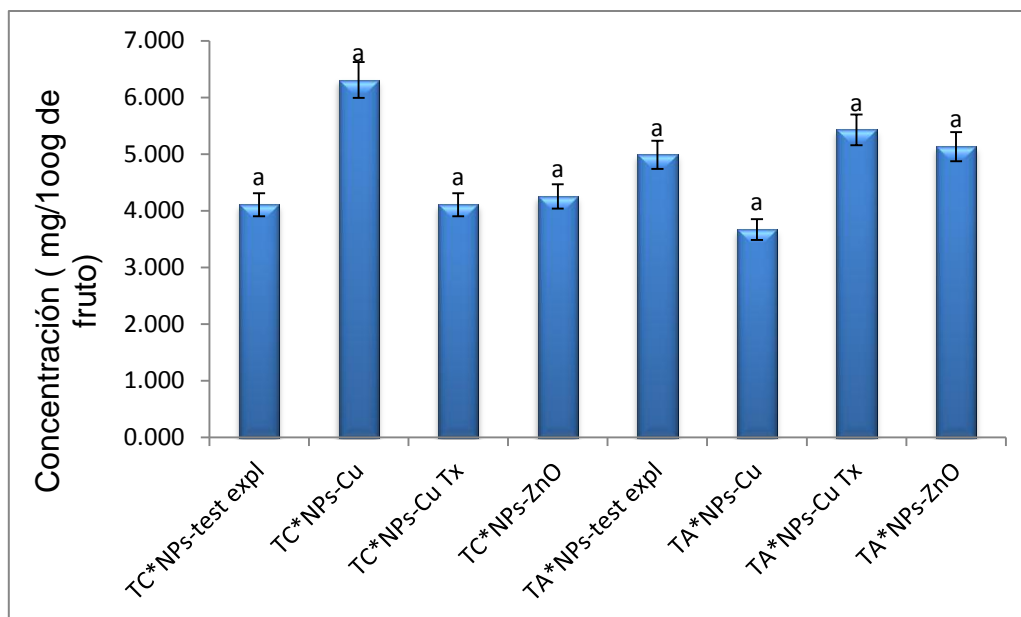


Figura 27. Concentración de vitamina C en pulpa de tomate por efecto de tres tipos de nanopartículas en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y con temperatura controlada. Letras iguales significan que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

CONCLUSIONES

En este trabajo se observa claramente el efecto antifúngico de las NPsCu y NPsZnO sintetizadas en el CIQA, lo cual se pudo corroborar en condiciones *in vitro* e *in vivo*, mostrando que *in vitro* los tratamientos con NPsCu tuvieron mejor control en cuanto al crecimiento y esporulación del hongo. La información obtenida también indica que la mezcla con NPsCu y NPsZnO mostraron buen nivel de control, pero en este caso se requirió una concentración más baja. Sin embargo, en los estudios realizados *in vitro* se observó que el tratamiento con NPsZnO tuvo mejor control del hongo en comparación de los tratamientos con NPsCu, aunque estos también mostraron un buen control sobre el hongo. Es importante continuar experimentando con este tipo de nanocompuestos que pudiesen tener el potencial de controlar de manera sustentable hongos fitopatógenos.

LITERATURA CITADA

- Allhoff, F., Lin, P. 2009.. Current and emerging ethical issues. Nanotechnology and society. 3 p 218
- Betancourt, R., Reyes, P.Y., Puente, B., Ávila-Orta, C., Rodríguez, O., Cadenas, G., Lira-Saldivar, H., Garcia-Cerda, L.A. 2014. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. Journal of Nanomaterials. Article ID 980545, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/980545>.
- Beyers, T., Vos, C., Aerts, R., Heyens, K., Vogels, L., Seels, B., Höfte, M., Cammue, B.P.A., De Coninck, B. 2014. Resistance against *Botrytis cinerea* in smooth leaf pruning wounds of tomato does not depend on major disease signaling pathways. Plant Pathology, 63: 165–173,
- Blancard, D. 2011 Enfermedades del Tomate Mundi-Prensa Libros, p 679.
- Bouwmeester H., Dekkers, S., Noordam. M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C., Voorde, S.E., Wijnhoven, S.W., Marvin, H.J., Sips, A.J., 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. Regul. Toxicol. Pharmacol. 53(1) 52-62.
- Bruna, J.E., Peñaloza, A., Guarda, A., Rodríguez, F., Galotto, M.J. 2012. Development of MtCu²⁺/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potential use in food packaging. Applied Clay Science, 58: 79–87.
- Buitrón, J.L., .2012. Estandarización y optimización de técnicas moleculares para la detección de *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* Y CMV (*Cucumber mosaic cucumovirus*) en rubros agrícolas de interés para el INIAP.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler, S. 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. Soil Biology and Biochemistry, 33: 1971–1980.
- Chena Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Mac B Wan L., 2005. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicology letters 163 (2): Pages 109–120.
- Chinnamuthu, C.R., Boopathi, P.M., 2009. Nanotechnology and agroecosystem. Madras Agricultural Journal, 96 (1–6), 17–31.
- Deepali, S., Jaspreet, R., Kaith, B.S., Mohinder, K., Sapna, S., 2011. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. Thin Solid Films. 519: 1224–1229.
- Fernández, A. 2006 Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas. Tesis doctoral Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Fisiología y Genética.
- Foladori, G., Invernizzi., N., 2008. Nanotecnologías en la alimentación y agricultura Universidad de la República Montevideo, 81-94

- Food and Agriculture Organization (FAO) Sin fecha. Manejo integrado de enfermedades <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s05.pdf>.
- García, M., Forbe, T., Gonzalez, E., 2010, Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. *Journal Ciência e Tecnologia de Alimentos* 573-581.
- Ghormade, V., Deshpande, M.V., Paknikar, K.M. 2011. Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*, 29: 792–803.
- Gruere, G.P. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries. 2012. *Food Policy*, 37: 191–198.
- He L, Yang L, Mustapha A, Lin M., 2010 Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological research* 166(3): 207-215.
- Internacional Development (AUSAID). Trade Information Brief. Vegetables, 2006. p. 61. <http://www.sadctrade.org/sadcreources>.
- Jayesh P. R., Arup, K. C., Siddhartha, P. Duttagupta, S M., 2008 Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles *Acta Biomaterialia* 3: 707-716.
- Lira-Saldivar, R.H., Lira-Valdes, N. y Hernández-Suárez, M. 2012. *Actividad Antimicrobial de Plantas de las Zonas Áridas de México*. Editorial Académica Española. ISBN 978-3-659-05317-7. 113 páginas.
- Liu, J., Guo, Z., Meng, F., Luo, T., Li, M., Liu, J. 2009. *Nanotechnology* 20, 125-130.
- Markovic, D.S., Zivkovic, D., Cvetkovic, D., Popovic, R. 2012. Impact of nanotechnology advances in ICT on sustainability and energy efficiency. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16: Pages 2966–2972.
- Mendoza-Uribe, G y Rodríguez-López, J.L. 2007. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*, 29: 161-186.
- Nagarajan Padmavathy and Rajagopalan Vijayaraghavan 2008 Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and technology of advanced materials* 9 (7pp).
- Novel thiosemicarbazone chitosan derivatives: Preparation, characterization, and antifungal activity. 2012. Qin, Y., Xing, R., Liu, S., Li, K., Meng, X., Li, R., Cui, L. *Carbohydrate Polymers*, 87: 2664–2670.
- Nuez, 2001. *El cultivo del tomate*. Ed. Mundi prensa, Madrid, España. P. 614.
- Omid S, Soheil P, Mohammad H.S. Majid J.A. 2013 Effect of Nano-iron Chelates on Growth, Peroxidase Enzyme Activity and Oil Essence of Cress (*Lepidium sativum* L.) *International Journal of Agronomy and Plant Production*. 4: 3583-3589.
- Ramyadevi J, Jeyasubramanian K, Marikani A, Rajakumar G, Rahuman, A. 2012. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 71: 114–116.

- Ranveer, R.C., Samsheer, N.P., Sahoo, A.K. 2013. Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Food and Bioproducts Processing, Food and Bioproducts Processings* 91: 370–375.
- Remya N, Saino H, Varghese, BG. Nair, T. Maekawa, Y. Yoshida, D. Sakthi K., 2010. Nanoparticulate material delivery to plants *Plant Science* 179 (3): 154-163.
- Ren, G., Hu, D., Cheng, EW., Vargas-Reusc, MA., Reip, P., Allaker, RP., 2008. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications *International Journal of antimicrobial agents* 33(6):587-90
- Reyes,C.P 1985 *Bioestadística Aplicada Trillas* 172-173.
- Ribera A, E. F 2007 Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *quillaja saponaria* mol. cultivada *in vitro* en *botrytis cinerea*. file:///C:/Documents%20and%20Settings/Hugo%20Lira/My%20Documents/Downloads/Alejandra__Ribera%20(1).pdf 5-10.
- Robles-Carrión, A., Díaz-Santos, A., Herrera-Isla, L., Cupull-Santana, R. 2011. Utilización de antagonistas como una alternativa ecológica en el control de enfermedades foliares en tomate. *Centro Agrícola*, 38(3): 37-43.
- Ruiz-Martínez, J., Vicente, A.A., Montáñez-Saenz, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C.N. 2012. Un tesoro perecedero en México: el tomate, tecnologías para prolongar su vida de anaquel. *Investigación y Ciencia* 54: 42-48.
- S/A 2008 Definición de nanotecnología <http://definicion.de/nanotecnologia/>
- Sanjog T T, Bijay, KS and Ram A 2013 Nanotechnology in Agroecosystem: Implications on Plant Productivity and its Soil Environment <http://dx.doi.org/10.4172/2325-9655.1000101>.
- Santiago J, Mendoza M, Borrego F., 1998. Evaluación de tomate (*lycopersicon esculentum*, mill) en invernadero: Criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana* 9(1): 59-65.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación (SAGARPA) Sin Fecha, Estudio de Oportunidades de Mercado e Inteligencia Comercial y Estudio de Logística Internacional de TOMATE http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/tomate.pdf.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación (SAGARPA) 2010, Monografía de cultivos Jitomate <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>.
- The American Phytopathological Society 2001 *Plagas y enfermedades del tomate* Mundi-Prensa Libros – 74.
- Yamamoto, O. 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int J Inorg Mater.* 3(7):643- 646.

- Yoon KY, Hoon BJ, Park JH, Hwang J., 2007. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. Sci. Total Environ. 373: 572-575.
- Zhang, X.F.; Dong, X.L. ; Huang, H. ; Liu, Y.Y. 2006. Microwave absorption properties of the carbon-coated nickel nanocapsules. Applied Physics Letters, 89: 165-171.