

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Síntesis de Nanopartículas de Óxido de Zinc y Oxido de Zinc con Plata Asistida con
Extractos de Plantas de Zonas Áridas y su Antagonismo contra Hongos
Fitopatógenas

Por:

JOAQUÍN ANTONIO MERLÍN TRUJILLO

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila; México.

Diciembre, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc con plata asistida con extractos de plantas de zonas áridas y su antagonismo contra hongos fitopatógenas
Por:

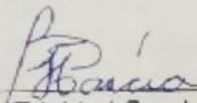
JOAQUÍN ANTONIO MERLÍN TRUJILLO


TESIS


Presentada como requisito para obtener el título de:


INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

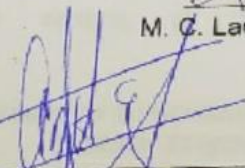
Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Hermila Trinidad García Osuna
Asesor Principal Interno


Dra. Herania Vera Reyes
Asesor Principal Externo


Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Coasesor


M. C. Laura María González Méndez
Coasesor


Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre, 2020



RESUMEN

En este trabajo se sintetizaron mediante una metodología de bajo impacto ambiental nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) y nanopartículas de ZnO con 1% de plata (NPs ZnO/Ag1%), utilizando extractos de hojas de plantas reconocidas por su actividad antimicrobiana: *Lippia graveolens*, *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua*. Los extractos de estas plantas contienen metabolitos como flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, lectinas, que nos permiten la reducción y estabilización de las nanopartículas. Además, los extractos de las plantas, pueden brindar un efecto sinérgico antagónico contra los patógenos.

Las nanopartículas (NPs) se sintetizaron a diferentes temperaturas de calcinación 80, 200, 300 y 400 °C, el incremento de la temperatura demostró tener mayor capacidad para reducir las fases secundarias, obteniendo mayor pureza de NPs a 400°C. Se confirmó la síntesis de las NPs ZnO y ZnO/Ag de cada extracto por medio de difracción de rayos x (DRX) y microscopia de barrido electrónico (SEM). El efecto del extracto en la generación de NPs ZnO y ZnO/Ag no generó diversidad en la morfología de las NPs. Estas mostraron una morfología irregular semiesférica, con tamaños menores a 30 nm.

Los ensayos de antagonismo de las NPs biosintetizadas demostraron tener un control sobre el crecimiento micelial de *A. solani* y *F. oxysporum*; siendo la concentración de 1000 mg L⁻¹ la más efectiva para el control *in vitro* de estos hongos fitopatógenos, las NPs sintetizadas lograron una inhibición aproximada del 60% con todas las NPs evaluadas. La adición de plata mejoró la capacidad antifúngica, de las NPs ZnO a concentraciones menores de 500 mg L⁻¹, también lograron disminuir en mayor porcentaje la producción de las esporas de los hongos.

El extracto tuvo un efecto en el antagonismo de las NPs contra las cepas evaluadas, el mejor efecto de inhibición y disminución en la producción de esporas de los hongos *A. solani* y *F. oxysporum* se observó con las nanopartículas generadas con el extracto de *L. graveolens* a 1000 mg L⁻¹, las cuales inhibieron en 65% (65.22 ±0.50) el crecimiento de *A. solani* y redujeron en 66 % (2.44x10⁷ ±0.006) la producción de esporas con respecto al control (5.57x10⁷ ±0.09 esporas/ml), mientras que la adición de plata a estas NPs ZnO (NPs ZnO/Ag-Lg) mejoró su capacidad de inhibir la producción de esporas

alcanzando un 78% ($1.79 \times 10^7 \pm 0.012$) de inhibición. En cuanto a *F. oxyporum* lograron inhibir el crecimiento en 62 % (62.4 ± 0.51) con las NPs ZnO y redujeron en 55 % la producción de esporas ($3.33 \times 10^7 \pm 0$) con respecto al control ($7.37 \times 10^7 \pm 0.05$), la adición de plata (NPs ZnO/Ag) incremento el efecto de disminución a 78 % ($1.67 \times 10^7 \pm 0.03$) la producción de esporas.

Los datos obtenidos por el uso extractos de *L. tridentata* y *F. cernua* como agentes reductores y estabilizadores en la síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc y plata, demostraron efecto antagónico en el crecimiento y esporulación de ambas cepas evaluadas. Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran las de NPs ZnO y ZnO/Ag, obtenidas con extractos de estas plantas, pueden emplearse como una alternativa en el control de hongos fitopatógenos, reduciendo el impacto ambiental por el uso de excesivo de fungicidas sintéticos.

AGRADECIMIENTOS

A mi **Alma Terra Mater**, que me dio la oportunidad de estudiar y brindarme las herramientas durante mi formación como profesionista.

Al **centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)**, por abrirme las puertas para realizar este trabajo y realizar mi estancia profesional de la carrera.

A la **Dra. Ileana Vera Reyes**, por brindarme su confianza, amistad, tiempo y sobre todo paciencia en el desarrollo de esta investigación, pero sobre todo muchas gracias por su incondicional apoyo, consejos y motivación para concluir mi etapa como estudiante.

A la **Dra. Hermila Trinidad García Osuna**, por su disponibilidad y amabilidad en la revisión de este trabajo, pero sobre todo por invitarme a realizar esta investigación en CIQA.

A mis coasesores, **Dra. Silvia Yudith Martínez Amador** y **M. C. Laura María Gonzales Méndez** por sus observaciones y aportaciones recibidas para la mejora de este trabajo de investigación.

A cada una de las personas que contribuyeron de una o otra manera en la realización de este trabajo, muchas gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado **a tres personas** muy importantes en mi vida, me enseñaron que el esfuerzo y la decisión generan oportunidades de cambio en la vida.

Mis padres: **Emilio Bruno Merlín Lara y Dora Isabel Trujillo Dominguez.**

Les dedico este logro importante en mi vida, sin sus palabras, apoyo y amor nada de esto se hubiera logrado. Gracias por darme la libertad de salir de casa en busca de mis sueños sin importar el distanciamiento por estos 5 años.

A mi abuela: **Gloria Trujillo Trujillo.**

Gracias por nunca dejarme vencer, tus palabras fueron la motivación necesaria para seguir adelante, tus consejos y experiencias me dieron la fuerza necesaria para continuar y sobreponerme a las dificultades.

A **cada uno de mis amigos:**

La lista es larga, pero gracias por las platicas y consejos durante este ciclo como universitarios, me llevo muchos recuerdos gratos que sin duda jamás se olvidaran.

ÍNDICE

	Pág
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ÍNDICE DE CONTENIDO	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VI
RESUMEN	VII
1 INTRODUCCIÓN.....	6
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 General.....	7
2.2 Específicos.....	7
2.3 Hipótesis.....	7
3 REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
3.1 La Nanotecnología en la Agricultura.....	8
3.2 Potencial de las nanopartículas de óxido de zinc en la agricultura.....	9
3.3 Nanopartículas de óxido zinc/plata.....	10
3.4 Síntesis de nanopartículas.....	13
3.4.1 Síntesis de nanopartículas con extracto de plata.....	13
3.4.2 Síntesis verde de nanopartículas de óxido de zinc.....	15
3.4.2.1 <i>Lippia graveolens</i> HBK.....	17
3.4.2.2 <i>Flourensia cernua</i> D.C.....	18
3.4.2.3 <i>Larrea tridentata</i> D.C.....	18
3.5 Enfermedades fúngicas de importancia agrícola.....	19
3.5.1 <i>Alternaria solani</i>	20
3.5.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	20
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1 Material vegetal.....	22
4.2 Preparación del extracto acuoso.....	22
4.3 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc asistida con extractos de planta.....	22
4.4 Biosíntesis de nanopartículas de óxido de zinc/plata asistida con extractos de plantas.....	23
4.5 Caracterización de nanopartículas.....	23
4.6 Actividad fúngica	23
4.7 Evaluación del efecto antifúngico in <i>vitro</i> de nanopartículas sintetizadas.....	24

	4.7.1 Efecto de las nanopartículas biosintetizadas sobre la producción de esporas.....	26
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
	5.1 Síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido zinc/plata.....	27
	5.2 Caracterización de las nanopartículas por DRX.....	27
	5.3 Caracterización de las nanopartículas por SEM.....	32
	5.4 Actividad antifúngica.....	34
	5.4.1 Antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>Alternaria solani</i>	34
	5.4.2 Evaluación del efecto de las nanopartículas sintetizadas en la producción de esporas de <i>Alternaria solani</i>	40
	5.4.3 Antagonismo <i>In vitro</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i>	42
	5.4.4 Evaluación del efecto de las nanopartículas sintetizadas en la producción de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	48
6	CONCLUSIONES	51
7	BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Nanopartículas de óxido de zinc y plata con actividad antimicrobial.....	12
Tabla 2	Nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con extractos de plantas y su efecto antimicrobiano.....	16
Tabla 3.	Bioensayo con nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag a diferentes concentraciones utilizadas <i>in vitro</i> contra hongos fitopatógenos.....	25
Tabla 4.	Descripción de la abreviatura empleada para distinguir las síntesis de NPs de ZnO y ZnO/Ag por los distintos extractos de plantas.....	25
Tabla 5.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Alternaria solani</i> por efecto de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc/plata sintetizadas con diferentes extractos de plantas.....	35
Tabla 6.	Efecto de las nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag sobre la producción de esporas de <i>Alternaria solani</i>	40
Tabla 7.	Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> por efecto de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc/plata sintetizadas con diferentes extractos de plantas.....	43
Tabla 8.	Efecto de las nanopartículas biosintetizadas sobre la producción de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso de obtención de nanopartículas de óxido de zinc a través de la síntesis verde.....	14
Figura 2.	Fotografías obtenidas de las nanopartículas de ZnO y Zn/Ag 1% después del proceso de calcinación a 400°C con extracto de <i>F. cernua</i>	27
Figura 3.	Difractograma de nanopartículas de ZnO sintetizadas con extracto de <i>F. cernua</i> a diferentes temperaturas de calcinación (80, 200, 300 y 400 °C).....	28
Figura 4.	Difractograma de las nanopartículas ZnO sintetizadas a 400°C de calcinación A) ZnO- <i>F. cernua</i> B) ZnO- <i>L. tridentata</i> C) ZnO- <i>L. graveolens</i>	29
Figura 5.	Difractograma de nanopartículas de ZnO/Ag sintetizadas con extracto de <i>F. cernua</i> a diferentes temperaturas de calcinación (80,200,300 y 400°C).....	30
Figura 6.	Difractograma de las nanopartículas de ZnO/Ag sintetizadas a 400 °C de calcinación A) ZnO/Ag- <i>F. cernua</i> B) ZnO/Ag- <i>L. graveolens</i>	31
Figura 7.	Micrografía de SEM de las nanopartículas de ZnO y ZnO+Ag1% asistidas con diferentes extractos de plantas. A) ZnO-Lp; B) ZnO/Ag-Lp C) ZnO-Lt D) ZnO/Ag-Lt; E) ZnO-Fc F) ZnO/Ag-Fc.....	33
Figura 8.	Cinética de crecimiento de <i>A. solani</i> bajo efecto de las nanopartículas sintetizadas por extractos de plantas A) ZnO-Lg B) ZnO/Ag-Lg C) ZnO-Lt D) ZnO/Ag-Lt E) ZnO-Fc F) ZnO/Ag-Fc.....	37
Figura 9.	Efecto de las nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag asistida por diferentes extractos de plantas en el crecimiento de <i>Alternaria</i>	39

solani. A) ZnO-Lp; B) ZnO/Ag-Lp; C) ZnO-Lt; D) ZnO/Ag-Lt E) ZnO-Fc; F) ZnO/Ag-Fc.....

Figura 10. Cinética de crecimiento de *F. Oxysporum* bajo efecto de las nanopartículas sintetizadas A) ZnO-Lp B) ZnO/Ag-Lp C) ZnO-Lt D) ZnO/Ag-Lt E) ZnO-Fc F) ZnO/Ag-Fc..... **45**

Figura 11. Efecto de las nanopartículas sintetizadas con diferentes extractos de plantas sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* A) ZnO-Lp B) ZnO/Ag-Lp C) ZnO-Lt D) ZnO/Ag-Lt E) ZnO-Fc **F)** ZnO/Ag-Fc..... **47**

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología (NT) es un área de la ciencia que se dedica al estudio, diseño, síntesis y manipulación de materiales, sustancias y dispositivos de la materia con un rango de dimensión de 1-100 nm (Gómez-Garzón, 2018). Existen diversos materiales derivados de la nanotecnología, sin embargo, las más conocidas y estudiadas son las nanopartículas (NPs). Las cuales son estructuras con al menos una dimensión entre 1 y 100 nm, que por sus propiedades físico-químicas y relación superficie-tamaño de volumen pueden mejorar las funciones biológicas de las mismas (Raskar and Laware, 2014).

La aplicación de las NT, a través del uso de las NPs han encontrado áreas de oportunidad en la industria como, la farmacéutica, médica y el sector agrícola (Alí *et al.*, 2020). En la actualidad, la agricultura se ve beneficiada por la amplia investigación del uso de NPs como nanofertilizantes, estimuladores de germinación y crecimiento de plántulas, nanosensores y nanopesticidas (Elmer & White, 2016). Debido a que elementos como la plata (Ag^{+1}), Cobre (Cu^{+2}), Zinc (Zn^{+2}) entre otros, son antagónicos de organismos fitopatógenos (Sahayaraj & Rajesh, 2015), uno de los métodos para la síntesis de NPs es la síntesis verde, la cual emplea extractos vegetales para la bioproducción de material tamaño nano, las biomoléculas del extracto, tales como proteínas, polisacáridos, alcaloides, taninos, fenoles, saponinas, entre otros; favorecen a la reducción de compuestos inorgánicos (Ag^{+1}) y estabilización de óxidos metálicos (ZnO , Al_2O_3), brindando un efecto sinérgico antagónico por los residuos de las biomoléculas antes mencionadas, además de ser un método de síntesis amigable con el ambiente (Boroumand-Moghaddam *et al.*, 2015). Hoy en día las aplicaciones excesivas de pesticidas han generado resistencia a plagas y enfermedades, además de impactar negativamente a los ecosistemas, generando desequilibrios en la producción de cultivos y aumento los gastos de producción (Lira-Saldívar *et al.*, 2018). En este contexto, el uso de NPs sintetizadas a partir de extractos de plantas, busca impactar en la agricultura ofreciendo métodos de control sobre organismos fitopatógenos de forma ecológica y sustentable (Valero-Galván *et al.*, 2014).

Esta investigación tuvo como objetivo utilizar extractos de plantas de *Florensia cernua*, *Larrea tridentata* y *Lippia graveolens* para sintetizar nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc con plata con la finalidad de observar su efecto antagónico contra el crecimiento de hongos de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani* dos hongos fitopatógenos causantes de importantes pérdidas económicas en los cultivos agrícolas.

2. OBJETIVOS

2.1 General

-Evaluar el efecto antifúngico de las nanopartículas sintetizadas con extractos de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens* y *Florensia cernua* contra hongos fitopatógenos como: *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*.

2.2 Específicos

-Sintetizar y caracterizar nanopartículas de óxido de zinc asistida con extractos de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens* y *Florensia cernua*.

-Sintetizar y caracterizar nanopartículas de óxido de zinc adicionadas con 1% de plata asistida con extractos de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens* y *Florensia cernua*.

-Evaluar el efecto antifúngico de las nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag contra *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*.

2.3 Hipótesis

1. Las nanopartículas de ZnO biosintetizadas con extractos de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens* y *Florensia cernua* mostrarán un efecto antagónico diferencial contra hongos fitopatógenos.
2. La adición de plata a las nanopartículas de ZnO biosintetizadas con extractos de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens* y *Florensia cernua* mejorarán su capacidad antifúngica.

3. REVISIÓN DE LITERATURA.

3.1 La Nanotecnología en la Agricultura.

La Nanotecnología (NT) es un área de la ciencia basada en el estudio, diseño, síntesis y manipulación de materiales, sustancias y dispositivos de la materia a escala de una mil millonésima parte de un metro (Gómez-Garzón, 2018). La NT proporciona aplicaciones novedosas al sector agrícola, las grandes expectativas para la protección, nutrición y regulación de cultivos se debe a la incorporación de nanopartículas (NPs) a las plantas, las cuales complementan funciones existentes y provocan cambios fisiológicos en las plantas debido al tamaño nanométrico, relación superficie-volumen y propiedades de las NPs, además que su aplicación potencializa la protección contra microorganismos (Ajey *et al.*, 2017).

Las NPs son estructuras con tamaños inferiores a 100 nanómetros (1×10^{-9}) las cuales pueden ser fabricadas a partir de diferentes materiales incluyendo metales como el oro (Au^{+1}), plata (Ag^{+1}), cobre (Cu^{+2}) y también de óxidos metálicos, donde se emplean materiales inorgánicos como ZnO, TiO_2 , AgO y MgO, siendo de gran interés las aplicaciones de las NPs metálicas de óxido de zinc (ZnO) dentro de la agricultura, ya que estas presentan actividades antibacterianas y antifúngicas sobre organismos patógenos de interés económico en la agricultura (Kriti *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2020) actuando como agentes promotoras de germinación y crecimiento de plantas (Ajey *et al.*, 2017; Adhikari, *et al.*, 2016).

Actualmente, el uso excesivo de agroquímicos sintéticos para el control de microorganismos patógenos en la agricultura ha conducido al deterioro del suelo, ecosistema generando resistencia de pesticidas a insectos y organismos fitopatógenos (Gahukar & Das, 2020). En este sentido la NT ofrece alternativas, al proporcionar herramientas que impacten en sectores de la agricultura, como los nanofertilizantes, nanopesticidas, nanoherbicidas y nanosensores que permiten incrementar el rendimiento de los cultivos de forma sustentable, reduciendo el impacto ambiental (Lira-Saldivar *et al.*, 2018).

3.2 Potencial de las nanopartículas de óxido de zinc en la agricultura

El zinc (Zn) es un micronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, las cuales lo requieren en pequeñas cantidades de entre 15 a 20 miligramo por kilogramo de tejido seco. Este elemento es indispensable para la transferencia de energía y aprovechamiento de foto-asimilados obtenidos de la fotosíntesis (Amezcu-Romero & Lara-Flores, 2017), siendo esencial para la síntesis del aminoácido triptófano, el cual es precursor del ácido indol acético (Auxina), la deficiencia de esta fitohormona provoca entrenudos cortos y crecimiento raquítico, además es requerido en seis clases de enzimas, oxidorreductasas, liasas, isómerasas, transferasas, hidrolasas y ligasas (Ajey *et al.*, 2017).

La deficiencia del Zn, como micronutriente es uno de los problemas más comunes en la producción de los cultivos en el mundo, estudios han demostrados con éxito que los nanopolvos pueden ser usados efectivamente como fertilizantes (Mendez-Arguello *et al.*, 2017). Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) tienen el potencial de aumentar el rendimiento y crecimiento de los cultivos, además brindan una absorción rápida y liberación lenta de nanofertilizantes, las NPs pueden reducir el consumo de fertilizantes reduciendo la contaminación por el uso excesivo de fertilizantes (Huiling-Zhang *et al.*, 2020).

Las NPs ZnO por su parte, han presentando gran interés en los últimos años debido a sus propiedades como excelente absorción de rayos UV, reflectantes, alta conductividad eléctrica y su efecto antimicrobiano (Ogunyemi *et al.*, 2019). Diversos estudios mencionan que las NPs ZnO son excelentes candidatos para su uso, como pesticida, fungicida o fertilizante en el sector agrícola, las características como su tamaño menor a 100 nm, hace que pueda interactuar fácilmente con moléculas biológicas. Diversos estudios han empleado NPs ZnO como agentes antifúngicos, antibacteriales, así como han evaluado su efecto potencial como estimulantes en la germinación de plántulas y crecimiento de plantas (Ahmandi & Namvar, 2020; Ajey *et al.*, 2016; Ranjith-Reddy *et al.*, 2016).

Diversos estudios de hongos fitopatógenos han demostrado que la actividad antifúngica de las NPs ZnO se debe principalmente a la generación de defectos en las estructuras de las hifas, (*Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*) además de generar cambios estructurales en la membrana celular microbiana, causando fuga del citoplasma y muerte del patógeno (Rajiv *et al.*, 2013; Brayner *et al.*, 2006). La literatura menciona que también que inhiben la producción de esporas en hongos como: *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium oxysporum* (Kriti *et al.*, 2020).

Estudios relacionados con la toxicidad generadas por las NPs ZnO aplicadas a plantas de interés agrícola ha demostrado que su aplicación genera aumento del porcentaje de germinación de semillas; la aplicación de NPs ZnO en semillas de *Vigna radiata* promovió el porcentaje de germinación y crecimiento de plántulas, este efecto se debe a que las NPs pueden penetrar el recubrimiento de semillas y estimular hormonas de crecimiento específicamente el ácido indolacético (Jayarambabu & Rao, 2016). En un estudio similar Singh y colaboradores (2016) aplicaron NPs ZnO de tamaño <16 nm sobre plantas de *Solanum lycopersicum* observando que el efecto es dependiente a la concentración, ya que a dosis bajas fomento el aumento de germinación, crecimiento de plántulas e índice de vigor de las semillas, además de que el contenido de clorofila y proteínas incrementaba a una concentración baja. Adicionalmente de ha reportado que el uso de NPs ZnO incrementa la biomasa, el área foliar, la actividad de radicales libres, la longitud de brotes y raíces, el contenido de proteínas, los pigmentos fotosintéticos y el rendimiento del cultivo (Ajey *et al.*, 2017; Jamdagni *et al.*, 2016))

3.3 Nanopartículas de óxido zinc/plata

Las NPs metálicas de óxido de zinc, cobre, hierro ya sea puras o mezcladas con plata, están siendo estudiadas debido a su potencial agrícola como promotoras de crecimiento, nanofertilizantes y antimicrobianas (Méndez-Arguello *et al.*, 2016), esto debido a que la actividad antimicrobiana de las NPs aumenta por el efecto de la adición de otro metal con capacidad antimicrobiana, aumentado así el efecto de inhibición en

comparación con las NPs de un solo componente metálico comerciales (Chen *et al.*, 2019).

Se ha comprobado que las NPs ZnO combinadas con plata incrementan la capacidad antibacteriana contra los microorganismos como *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Nadeem *et al.*, 2019). Este efecto se observa también sobre hongos fitopatógenos como *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* (Esparza-Arredondo *et al.*, 2016), obteniendo mayor inhibición de crecimiento radial en comparación con las NPs ZnO puras. La investigación de Muñoz-Ordoñez *et al.*, (2020), demuestra que la aplicación de NPs ZnO/Ag sintetizadas con extracto de *Flourensia cernua* presenta un efecto de inhibición en el crecimiento de la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* inhibiéndose a concentración de 250 mgL⁻¹. En la tabla 1 se muestran ejemplos del uso combinado de NPs ZnO/Ag contra hongos y bacterias patógenas, cabe resaltar que la actividad antimicrobiana depende del tamaño, forma y método de síntesis de la nanopartícula (Zhang *et al.*, 2020).

Tabla 1. Nanopartículas de óxido de zinc y plata con actividad antimicrobial.

TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm)	MICROORGANISMO	REFERENCIA
30-40	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Patiño-Herrera <i>et al.</i> , 2018
10-30	<i>Staphylococcus aureus</i>	Shakerimoghaddam <i>et al.</i> , 2020
10	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Muñoz- Ordoñez <i>et al.</i> , 2020
10-30	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Esparza-Arredondo <i>et al.</i> , 2016
38	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> y <i>P. vulgaris</i>	Thatikayala <i>et al.</i> , 2020
40	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Zare <i>et al.</i> , 2019
19-68	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nadeem <i>et al.</i> , 2019

3.4. Síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas se pueden sintetizar por métodos físicos, químicos y biológicos. El método físico implica técnicas como, dispersión coloidal, fragmentación física y muchas otras donde se utilizan equipos costosos, presión y alta temperatura (Argawal *et al.*, 2017). Por su parte el método químico emplea síntesis hidrotermal, coprecipitación, procesamiento sol-gel (Ahmandi & Navar, 2020). La síntesis de NPs presenta efectos adversos asociados con la toxicidad de los reactivos empleados en los métodos físicos y químicos arriba expuestos, esto en general se debe por el empleo de sustancias tóxicas absorbidas en las superficies durante la síntesis, por ende, la búsqueda de alternativas más amigables con el medio ambiente ha generado el desarrollo de técnicas menos contaminantes para el medio ambiente, como la síntesis verde (Gómez-Garzón, 2018). La síntesis verde es la bioproducción de material nanoparticulado empleando material metálico, para la producción de NPs, este método busca ser amigable con el medio ambiente y reducir costos de producción al utilizar extractos de plantas como agentes reductores. La síntesis verde está basada en el principio de biorremediación, donde las plantas son usadas para extraer y recuperar metales de suelos contaminados (Hernández-Díaz *et al.*, 2020)

3.4.1 Síntesis de nanopartículas con extractos de plantas

La síntesis de NPs mediante el uso de extractos de plantas han sido desarrolladas por su gran potencial de bio-reducción de cationes metálicos de plata (Ag^+), Oro (Au^{+3}), Cobre (Cu^{+2}) y zinc (Zn^{+2}) u óxidos metálicos, como el óxido de zinc (ZnO), óxido de titanio (TiO_2), óxido de aluminio (Al_2O_3), estos son utilizados principalmente como agentes antimicrobianos contra diversos microorganismos fitopatógenos (Novelles *et al.*, 2017). Esta técnica permite la producción de NPs a gran escala permitiendo la obtención de nanomateriales con alta pureza y homogeneidad además de ser amigable con el medio ambiente y económica para su aplicación en la agricultura (Argawal *et al.*, 2017; Gómez-Garzón, 2018). El uso de extracto de plantas para la síntesis de NPs se debe principalmente a que estas contienen biomoléculas como terpenoides, alcaloides, fenoles, taninos, flavonas, cetonas, aldehídos, proteínas, vitaminas, saponinas y polisacáridos entre otros compuestos, los cuales tienen una

alta capacidad para la reducción de metales (Vijayaraghavan & Ashokkumar, 2017). De acuerdo con lo anterior el uso de extractos de plantas pueden actuar como agentes reductores, así como estabilizadores en la síntesis de NPs, las cuales quedan con recubrimiento orgánico, que mejora su estabilidad y disminuye su agregación (Nadeem *et al.*, 2019).

De manera general, el proceso empleado para la síntesis verde de NPs ZnO se lleva a cabo de la siguiente manera: se utilizan las hojas, flores o raíces secas de algún material vegetal (como las empleadas en esta investigación) las cuales se muelen hasta obtener un polvo, después se mezcla el polvo con algún solvente (agua o etanol) calentándolo a una temperatura determinada por cierto tiempo, para obtener los metabolitos secundarios del material vegetal, posteriormente se filtra y deja enfriar, para realizar la obtención de NPs se mezcla la solución madre de algún compuesto químico, como puede ser el nitrato de zinc con una cierta cantidad del extracto obtenido, se calienta a una temperatura entre 80-100 °C, a partir del cual se obtiene un material precursor que posteriormente es calcinado a temperaturas mayores a 300°C, para obtener finalmente el óxido deseado, el cual se caracteriza para su aplicación final como se muestra en la figura 1.

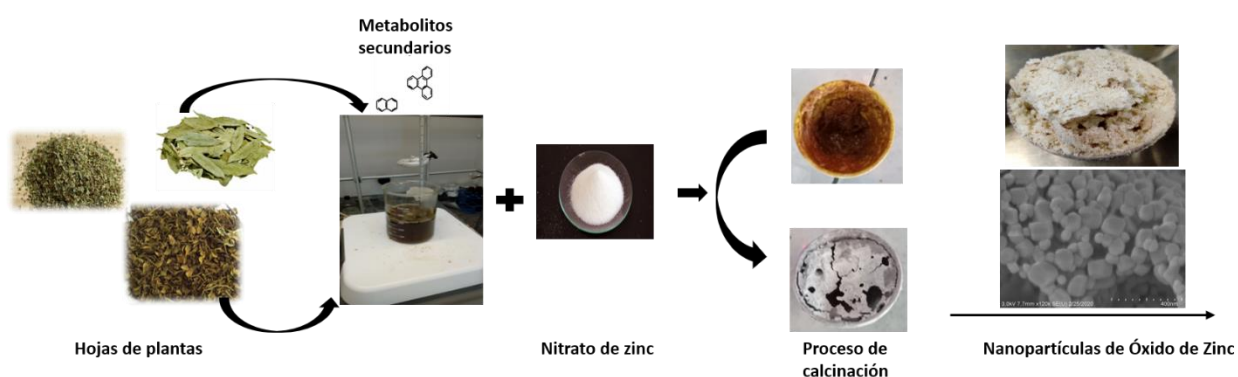


Figura 1. Proceso de obtención de nanopartículas de óxido de zinc a través de la síntesis verde.

3.4.2 Síntesis verde de nanopartículas de óxido de zinc

La síntesis biológica de ZnO mediante el uso de diferentes extractos de plantas está surgiendo como nueva área de interés hoy en día, el enfoque biológico de la

síntesis de las nanopartículas (NPs) tiene una ventaja sobre los productos químicos tradicionales y métodos físicos, los cuales implican varios productos químicos tóxicos para la síntesis de NPs, que más tarde puede ser la razón de varios problemas de salud debido a la toxicidad; mientras que el método verde, es un método ecológico libre de contaminantes que produce NPs puras favorables para aplicaciones biológicas (Ajey *et al.*, 2016).

Las NPs ZnO han sido de gran interés entre los investigadores, debido principalmente a su simplicidad, respeto por el medio ambiente y su potencial para actuar como agente antibacteriano, considerando así una alternativa de empleo para sustituir los químicos tóxicos empleados para el control de patógenos (Aki *et al.*, 2020). Este método ofrece ventajas de ser rentable, ecológico, sostenible y adecuado a la producción a gran escala debido a que las plantas producen gran número de metabolitos como alcaloides, compuestos fenólicos y terpenoides, etc., los cuales están implicados para generar nanopartículas, con características diversas en el tamaño y forma, debido a las propiedades reductoras y estabilizadoras de las plantas en la síntesis de nanopartículas (Hernández-Díaz *et al.*, 2020).

Las NPs sintetizadas por extracto de plantas son más estables y biocompatibles debido al proceso de recubrimiento con surfactantes biogénicos o agentes de recubrimiento que tienen un menor impacto al ambiente, es una rápida tasa de síntesis en comparación con los producidos por métodos físicos y químicos de síntesis de nanopartículas (Huiling-Zhang *et al.*, 2020). La tasa más rápida de síntesis se debe a la capacidad biológica de actuar como catalizador de reacciones en medios acuosos en temperatura y presión estándar (Ajey *et al.*, 2016). Diversos extractos han sido utilizados para la síntesis de NPs ZnO, dependiendo del tipo de planta estas presentan morfología y tamaño diferente, el cual también está relacionado con su actividad antimicrobiana (tabla 2). se ha reportado que a menor tamaño de NPs, mayor es su actividad antimicrobiana (Lakshmeesha *et al.*, 2020).

Tabla 2. Nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con extractos de plantas y su efecto antimicrobiano.

PLANTA	TAMAÑO (nm)	PATÓGENO	REFERENCIA
<i>Melia azedarach</i>	30-40	<i>Cladosporium cladosporioides, Fusarium oxysporum</i>	Lakshmeesha <i>et al.</i> , 2020
<i>Eucalyptus globules</i>	57-70	<i>Botryosphaeria dothidea, Alternaria mali, Diplodia seriata</i>	Ahmad <i>et al.</i> , 2020
<i>Pongamia glabra</i>	50-60	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sahayaraj <i>et al.</i> , 2020
<i>Tmamnindus indica</i>	50-60	<i>Alternaria alternata, Aspergillus nigris, Botrytis cinérea, Fusariumm oxysporum</i>	Thatikayala <i>et al.</i> , 2020
<i>Matricaria chamonilla</i>	48	<i>Penicilliumexpansum, Aspergillus niger</i>	Subhapriya & Gomathipriya, 2018
<i>Nycanthes arbortrisitis</i>	16-62	<i>Aspergillus brasiliensis, Aspergillusflavus, bacillus subtilis</i>	Jamdagni <i>et al.</i> , 2016
<i>Punica granatum</i>	50-100	<i>Aspergillus niger</i>	(Mishra & Sharma, 2018)
<i>Aloe barbedensis</i>	15	<i>E. coli, Pseudomonas aeruginosa y S. aureus</i>	Alí <i>et al.</i> , 2016
<i>Mirabilis jalapa</i>	19-36	<i>P. aeruginosa, K. pneumonia, B. subtilis, E. coli</i>	Zare <i>et al.</i> , 2019
<i>Thymus vulgaris</i>	50	<i>E. coli y S. aureus</i>	Nadeem <i>et al.</i> , 2019

México presenta una gran diversidad de especies vegetales, las cuales han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico para evaluar su potencial y actividad biológica sobre microorganismos patógenos de cultivos agrícolas (López-Benítez *et al.*,

2005). Especialmente el crecimiento de las plantas en zonas áridas donde las condiciones de salinidad, temperaturas altas y bajas, entre otros factores abióticos promueven la expresión de compuestos generados por medio del metabolismo secundario, los cuales destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, lectinas entre otros generando efectos contra organismos fitopatógenos con acción bactericida y fungicida (Andrade-Bustamante *et al.*, 2017).

En este trabajo se utilizaron tres especies de plantas diferentes para observar si el tipo de extracto utilizado para la síntesis de las nanopartículas, tenía un efecto sobre su actividad antifúngica, considerando que los extractos pueden tener un efecto sinérgico antagonista contra el hongo fitopatógeno; utilizamos plantas reportadas con actividad antimicrobiana como orégano (*Lippia graveolens*) gobernadora (*Larrea tridentata*) y hojásén (*Flourenzia cernua*).

3.4.2.1 *Lippia graveolens* HBK

El orégano (*Lippia graveolens* HBK) es un arbusto perenne que se desarrolla en zonas áridas dentro del Desierto Chihuahuense, se distribuye principalmente en Coahuila, Zacatecas y Chihuahua. Esta especie pertenece a la familia Verbenaceae, su principal uso es como planta medicinal para afecciones respiratorias, trastornos digestivos e infecciones por hongos, virus se emplea empleando las hojas y tallos para extraer el aceite esencial (SEMARNAT, 2001).

El extracto de *L. graveolens* presenta compuestos terpénicos producidos por el metabolismo secundario de la planta como función defensiva contra el ataque de insectos, además de compuestos fenólicos como el timol, carvacrol y eugenol que sugieren una actividad bactericida en el extracto de *Lippia graveolens* (Luján *et al.*, 2010). El modo de acción de los terpenos no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de compuestos lipofílicos (Rodríguez-García *et al.*, 2016).

3.4.2.2 *Flourensia cernua* D.C.

El hojásén (*Flourensia cernua*) es una planta endémica de las zonas áridas y semiáridas de México, perteneciente a la familia Asteraceae, es un arbusto frondoso de 1-2 metros de altura, sus hojas son de color verde opaco, ovaladas con flores amarillas su principal uso es medicinal, ya se emplean contra la digestión y problemas gastrointestinales (Gamboa-Alvarado *et al.*, 2003).

F. cernua contiene metabolitos secundarios tales como compuestos polifenólicos, benzofuranos y benzopirenos los cuales tienen usos terapéuticos debido a sus propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes que le dan un uso potencial para el control de enfermedades (De Rodríguez *et al.*, 2012). La toxicidad de los fenoles en los microorganismos se atribuye a la inhibición enzimática por oxidación de compuestos generando especies reactivas de oxígeno produciendo muerte celular (Andrade-Bustamante *et al.*, 2017).

De acuerdo a estudios obtenidos, los compuestos fenólicos de *F. cernua*, contienen β -cariofileno y β -eudesmol, ambos compuestos sesquiterpenos y con efecto antiinflamatorio, citotóxicos, anti-algas, insecticida y antimicrobiano de fitopatógenos (De Rodríguez *et al.*, 2017; Mata *et al.*, 2003). El poder antimicrobiano del extracto de *F. cernua* ha sido evaluado contra hongos fitopatógenos, como: *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium digitatum*; *Penicillium expansum* y *Fusarium oxysporum* (De Rodríguez *et al.*, 2017; De León *et al.*, 2013; Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007). También se ha reportado un estudio en que se usó un extracto en la formulación de un recubrimiento el cual fue efectivo para inhibir los microorganismos de postcosecha del tomate logrando extender su vida útil (de Jesús Salas-Méndez *et al.*, 2019).

3.4.2.3 *Larrea tridentata* D.C.

La gobernadora (*Larrea tridentata* D.C.), es un arbusto perenne de los Desiertos Chihuahuense, Sonorense perteneciente a la familia Zygophyllaceae, comúnmente se le denomina gobernadora por su dominancia en grandes extensiones de zonas áridas

del norte de México. Las características de esta planta es que producen una resina que le brinda mecanismos de defensa contra insectos y protección solar. Los metabolitos secundarios producidos por *L. tridentata* son biopolímeros fenólicos, saponinas, flavonoides y el ácido nordihidroguairacético (NDGA) que se encuentra presentes en la resina producida en tallos y hojas (Lira-Saldívar, R.H 2003). El modo de acción de los fenoles en los microorganismos se le atribuye a la inhibición enzimática por oxidación de compuesto (Andrade-Bustamante *et al.*, 2017).

Las condiciones adversas donde se desarrollan las especies (*L. graveolens*, *L. tridentata* y *F. cernua*) provocan metabolitos secundarios, los cuales además de servirles de defensa contra organismos y factores abióticos, son las principales moléculas utilizadas para la reducción de metales durante la síntesis verde de NPs metálicas o óxidas metálicas, de esta forma se pueden generar cultivos para obtener biomasa necesaria para la aplicación de NPs en la agricultura, brindando así, una oportunidad de empleo para los habitantes de zonas áridas, los cuales por las condiciones extremas no producen cultivos que les brinden mejor calidad de vida.

3.5. Enfermedades fúngicas de importancia agrícola

Las enfermedades de las plantas son de interés agronómico para el hombre, debido a que generan importantes pérdidas económicas al perjudicar a los cultivos y sus derivados (Agrios, 2005). Estas enfermedades son producidas principalmente por hongos, bacterias, nemátodos y virus; de los cuales los hongos ocasionan mayor relevancia económica debido a que su presencia está durante la producción y almacenamiento de los alimentos, siendo tóxicos para los seres humanos y animales (Valero-Galván *et al.*, 2014). Dentro los principales hongos que causan mayores pérdidas económicas en México se destacan, los hongos fitopatógenos tales como: *Alternaria*, *Botrytis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* y *Penicillium* (López & Martins, 2008).

Actualmente, el método de control más utilizado para el control de estos patógenos es a través de fungicidas sintéticos, los cuales han provocado resistencia

en los hongos además de que su empleo excesivo genera residuos tóxicos al ambiente y al hombre (Gahukar & Das, 2020).

3.5.1 *Alternaria solani*

El tizón temprano, es el nombre común de la enfermedad producida por *Alternaria solani*, el cual afecta desde hojas, tallos, flores y frutos de plantas anuales, en particular hortalizas y plantas de ornato, aunque también afecta ciertas partes de árboles como cítricos y manzanos (Agrios, 2001). Sus síntomas aparecen en forma de manchas y tizones foliares que van de café oscuro a negro y cuando se extienden casi forman anillos concéntricos provocando que las áreas afectadas se tornen amarillas, luego pardas con hojas colgadas, finalmente la planta entera puede defoliarse y morir (Agrios, 1999). Este hongo fitopatógeno es considerado como especie cosmopolita ya que se encuentra distribuido en todo el mundo, desde lugares templados hasta los más calientes; *A. solani* puede generar pudriciones del fruto y tubérculos como en el caso del tizón temprano de la papa y del tomate, la mancha foliar del frijol, tabaco, el tizón del tallo de la zanahoria, clavel, crisantemo (Gutiérrez-Ortega, *et al.*, 2004).

A. solani es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento (Pavón *et al.*, 2015). La mejor manera de manejar esta enfermedad es mediante un control preventivo mediante la aplicación de fungicidas sintéticos, debido a que una vez que el tizón temprano se establece en el cultivo es muy difícil su control (Gutiérrez-Ortega *et al.*, 2004).

3.5.2 *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* es un patógeno cosmopolita que afecta más de 80 cultivos de importancia comercial tales como el tomate, cebolla y ajo presentando pérdidas económicas al reducir la explotación del cultivo (Agrios, 2007). Dentro de este género se encuentra *Fusarium oxysporum*, el cual causa la enfermedad conocida como marchitez, los primeros síntomas se presentan con el amarillamiento de las hojas con clorosis y marchitamiento, siendo la forma más clara de identificarlo mediante un corte

longitudinal en el tallo donde se observa un anillo de color marrón oscuro o café; *F. oxysporum* afecta el sistema radical de la planta, obstruyendo los vasos xilemáticos provocando marchites y pudrición de la planta (Agrios, 2001). Esta enfermedad ataca principalmente al tomate, banano, algodón, lenteja, clave y crisantemo ocasionando pérdidas económicas muy significativas, ya que limita la explotación de los cultivos (Arbeláez-Torres, 2000).

El tratamiento actual para su control más efectivo es a través de fungicidas sintéticos siendo la medida fitotécnica más importante para aumentar los rendimientos de los cultivos (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020).

Por tal motivo, en este trabajo se propone el uso de las NPs ZnO como agentes antifúngicos para el control de hongos fitopatógenos como: *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*, como una alternativa al presentar menor impacto ambiental, además de que el empleo de extractos de plantas para la generación de NPs ZnO le brinda características adicionales al efecto antimicrobiano, siendo más amigables con el medio ambiente, en comparación con las excesivas aplicaciones de fungicidas sintéticos, los cuales han generado resistencia a estos patógenos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) en el Departamento de Biociencias y Nanoagrotecnología durante el periodo de enero-diciembre 2019., dirección: Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coahuila; México.

4.1 Material vegetal

Se colectaron hojas y tallo de *Flourensia cernua* D.C.(Hojasén), *Lippia graveolens* HBK (Orégano) y *Larrea Tridentata* D.C.(Gobernadora) de los municipios de Arteaga y Saltillo, Coahuila durante la primavera -verano 2018. El material vegetal se secó a una temperatura de 70 °C por 24 h. Posteriormente, el material fue pulverizado con ayuda de una licuadora, éste se guardó en bolsas plásticas en oscuridad y un lugar libre de humedad hasta su uso como materia prima en la preparación de extractos empleados en la síntesis de nanopartículas.

4.2 Preparación del extracto acuoso

Para la extracción de metabolitos secundarios de las tres muestras de plantas, se tomaron 10 g de la muestra y se realizó un método de decocción a 60 °C por una hora. Después se filtró con papel filtro, para eliminar los restos vegetales recolectando el sobrenadante. Se realizó una segunda filtración con un embudo de filtro poroso de 22 micras, se recolectó el filtrado y se almacenó a 4 °C hasta su uso. El extracto se preparaba fresco y no se almacenaba por más de 7 días.

4.3 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc asistida con extractos plantas

Se preparó una solución 0.5 M de nitrato de zinc la cual se mezcló con en el extracto acuoso de las plantas descrito anteriormente. La mezcla se mantuvo a 90 °C en agitación constante hasta conseguir una pasta (el tiempo de reacción era menor a 30min). La pasta obtenida se dejó enfriar, y se transfirió a un crisol de porcelana para dejar a 80 °C por 12 horas. Posteriormente, se llevó a una mufla donde se realizó un

tratamiento térmico a 80, 200, 300 y 400 °C por 1 h. La muestra se pulverizó con ayuda de un mortero de porcelana y se guardó en tubos de centrifuga hasta su uso.

4.4. Biosíntesis de nanopartículas de óxido de zinc/plata asistida con extractos plantas

Se preparó una solución 0.5 M de nitrato de zinc a la cual se le adicionó el 1 % (p/p) de nitrato de plata en relación a la cantidad de nitrato de zinc, esto se disolvió con el extracto acuoso de las plantas descritas anteriormente. La mezcla se mantuvo a 90 °C en agitación constante hasta conseguir una pasta (el tiempo de reacción era menor a 30 min). La pasta obtenida se dejó enfriar, y se transfirió a un crisol de porcelana para desecar a 80 °C por 12 horas. Posteriormente, se llevó a una mufla donde se realizó un tratamiento térmico a 80, 200, 300 y 400 °C por 1 h. La muestra se pulverizó con ayuda de un mortero de porcelana hasta obtener un polvo el cual se guardó en tubos de centrifuga hasta su uso.

4.5 Caracterización de nanopartículas

Se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X (DRX) de las NPs utilizando un difractómetro Rigaku Ultima IV con una fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$, operado a 44 mA y 40 Kv, en un rango de barrido de 10 a 80° en escala 2θ , a una velocidad de 0.02 °/s. Se identificaron las fases cristalinas presentes en la muestra, mediante la comparación con los patrones estándar de la base de datos del International Centre for Diffraction Data (ICDD). El tamaño de cristalita se determinó con la ecuación de Scherrer (Cullity, 1956) usando los patrones de difracción obtenidos de cada muestra mediante el uso del software Jade 6. Adicionalmente se analizó la morfología de las NPs mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

4.6 Actividad antifúngica

Las cepas utilizadas en este proyecto de *Alternaria solanni* y *Fusarium oxysporum*, fueron adquiridas de la colección del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Estas se multiplicaron a través de explantes en Agar Papa Dextrosa (PDA) adicionado con extracto de malta y

extracto de levadura con el fin de obtener material necesario para el establecimiento del bioensayo.

4.7 Evaluación del efecto antifúngico *in vitro* de las nanopartículas sintetizadas

Para evaluar la actividad antifúngica de las NPs de ZnO y ZnO+Ag 1% contra las dos cepas de hongos fitopatógenas, se utilizó la metodología de medio envenado descrita por Esparza-Arredondo (2016). En este estudio se manejaron las siguientes concentraciones de NPs de ZnO y ZnO+Ag 1%: 0, 150, 250, 500, y 1000 mgL⁻¹. Se preparó medio PDA (Agar Papa Dextrosa) adicionado con extracto de malta y extracto de levadura, el cual se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Al mismo tiempo se preparó una solución de nanopartículas en 10 ml de agua destilada estéril y se sonicó en tres ciclos de 15 min. Finalizada la esterilización del medio PDA, se completó con la solución de NPs previamente sonicadas, se agitó brevemente para homogenizar la solución con el medio y se vació en cajas Petri.

Para el establecimiento del ensayo, los hongos se inocularon por medio de explante en los medios y se incubaron a 27 °C por 10 días. El parámetro evaluado fue el diámetro de crecimiento radial, el cual se midió con ayuda de un vernier, para poder calcular el porcentaje de inhibición con la formula descrita por Orberá *et al.*, (2009).

$$PICR = (R1 - \frac{R2}{R1}) \times 100$$

Dónde:

PICR= Es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

R1= Representa el valor promedio del radio de crecimiento del hongo.

R2= Es el valor promedio del radio de la colonia inhibida.

Para concluir se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$). El análisis estadístico hizo con el software InfoStat versión 2020

Tabla 3. Bioensayo con nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag a diferentes concentraciones utilizadas *in vitro* contra hongos fitopatógenos.

Tratamiento	<i>Alternaria solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
1	0	0
2	150	150
3	250	250
4	500	500
5	1000	1000

Tabla 4. Descripción de la abreviatura empleada para distinguir las síntesis de NPs de ZnO y ZnO/Ag por los distintos extractos de plantas.

NPs ZnO	Descripción
ZnO-Lp	NPs de ZnO sintetizadas con extracto de <i>Lippia graveolens</i>
ZnO-Lt	NPs de ZnO sintetizadas con extracto de <i>Larrea tridentata</i>
ZnO-Fc	NPs de ZnO sintetizadas con extracto de <i>Flourensia cernua</i>
Adicionadas con plata 1%	
ZnO/Ag-Lp	NPs de ZnO/Ag sintetizadas con extracto de <i>Lippia graveolens</i>
ZnO/Ag-Lt	NPs de ZnO/Ag sintetizadas con extracto de <i>Larrea tridentata</i>
ZnO/Ag-Fc	NPs de ZnO/Ag sintetizadas con extracto de <i>Flourensia cernua</i>

4.7.1 Efecto de las nanopartículas bio-sintetizadas sobre la producción de esporas.

Se utilizó el procedimiento descrito por Bustillo (2015) para cuantificar suspensiones de esporas de hongos. Para lo cual, se agregaron 10 mL de agua destilada estéril al hongo dentro de la caja Petri, se agitó durante 2 min con movimientos circulares. Posteriormente, se decantó la suspensión sobre un tubo de centrifuga de 15 mL, al cual se le adicionó 4 gotas de lactofenol. La muestra se agitó brevemente y se dejó en reposo durante 5 min. Finalmente se volvió agitar durante 2 min más. Se transfirieron 1 ml de la suspensión de esporas a otro tubo de centrifuga para su observación. La muestra se diluyó 2 veces más (10^{-2}) hasta obtener un conteo más apropiado. Para el recuento de esporas se utilizó una cámara de Neubauer donde se le agregaron 20 μ l de suspensión de esporas diluidas y se observó en un microscopio usando el objetivo de 10X.

Para el cálculo se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Número total de esporas} = \frac{\text{No. de células} \times \text{dilución} \times 10^4}{\text{No. de áreas contadas}}$$

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc/plata.

Para la síntesis de las NPs. Como ya se mencionó anteriormente, se evaluaron varias temperaturas de calcinación (80, 200, 300 y 400 °C). Después del tratamiento de calcinación se obtuvo un polvo el cual fue homogenizado con mortero y pistilo, posteriormente estas muestras fueron caracterizadas para confirmar la formación de las NPs. Las muestras obtenidas después del proceso de calcinación a 400 °C (figura 2).

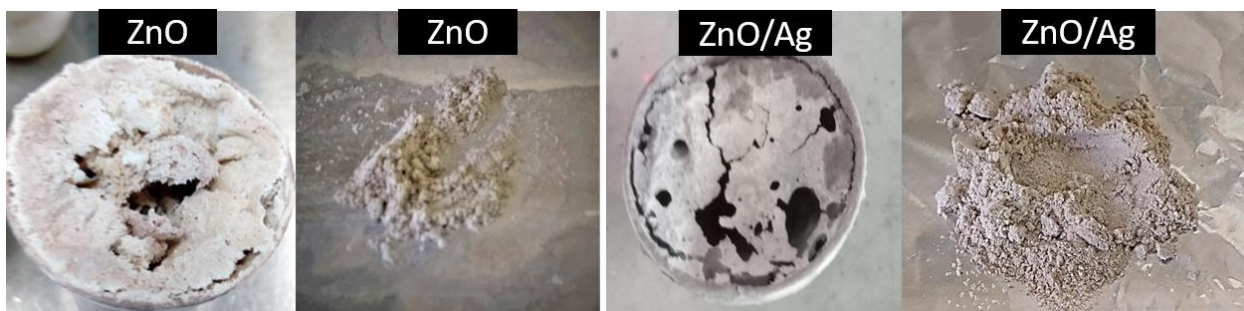


Figura 2. Fotografías obtenidas de las nanopartículas de ZnO y Zn/Ag 1% después del proceso de calcinación a 400°C con extracto de *F. cernua*.

5.2 Caracterización de las nanopartículas por DRX.

Las NPs ZnO y ZnO/Ag sintetizadas por cada uno de los extractos de *L. graveolens*, *L. tridentata* y *F. cernua* se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX). Para facilitar la identificación de los patrones de difracción del ZnO y Ag, el difractograma se comparó con reportado en el banco de datos del ICDD (International Centre Diffraction Data).

En todas las muestras en donde se sintetizó NPs ZnO, se observa la presencia de picos característicos localizados a 31.84, 34.44, 36.26, 47.56, 56.6, 62.9, 66.52, 67.96, 69.12 y 72.76° atribuidos a las reflexiones de los planos (100), (002), (101), (102) (110), (103), (200), (121), (201), y (202) con una estructura hexagonal correspondiente al ZnO (JCPDS No. 36-1451).

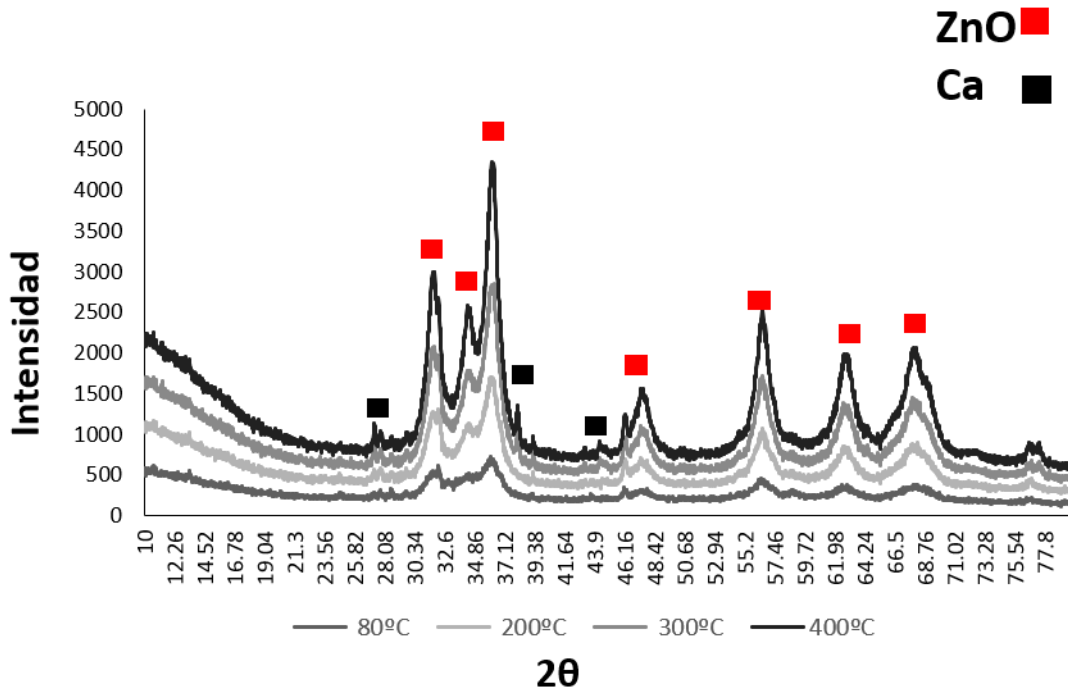


Figura 3. Difractograma de nanopartículas de ZnO sintetizadas con extracto de *F. cernua* a diferentes temperaturas de calcinación (80, 200, 300 y 400 °C).

Los difractogramas obtenidos de las NPs ZnO sintetizadas con extracto de *F. cernua* (ZnO-Fc) a diferentes temperaturas se muestra en la figura 3; los resultados revelaron que el aumento de temperatura en el proceso incineración generó mayor intensidad en los picos característicos del ZnO (resaltados en la figura 3); por lo que, a mayor temperatura, hay una mayor amplitud en la intensidad de los picos del óxido de zinc, la literatura establece que la intensidad de estos picos se incrementa también al aumentar la temperatura (Estell *et al.*, 1996). Adicionalmente se observa picos localizados a 28.38, 40.54 y 50.14°, que corresponden a las reflexiones (110), (200) y (211) de una fase identificada como calcio (Ca). Con base a lo anterior, se tomó la decisión de generar NPs ZnO a 400°C de calcinación.

El patrón de DRX de las NPs utilizadas se observa en la figura 4, el difractograma obtenido con las NPs ZnO sintetizadas con extracto de *L. graveolens* se muestran en la figura 4C; estas presentaron mayor pureza al no presentar reflexiones

adicionales relacionadas con fases secundarias, como el calcio, efecto contrario se observa en las NPs ZnO sintetizadas con extractos de *F. cernua* y *L. tridentata*, donde el patrón de difracción muestra la presencia de calcio, resaltados en la figura 4A y 4B respectivamente.

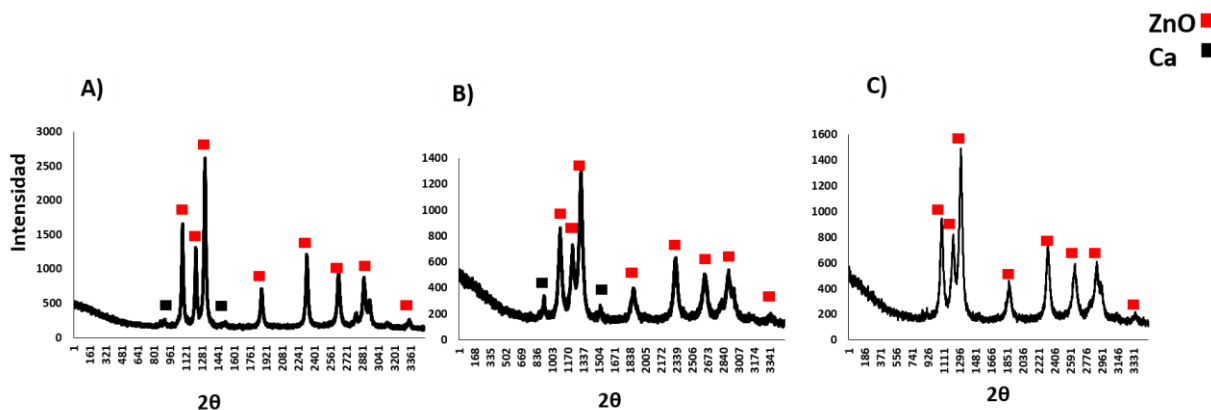


Figura 4. Difractograma de las nanopartículas ZnO sintetizadas a 400°C de calcinación **A)** ZnO-*F. cernua* **B)** ZnO-*L. tridentata* **C)** ZnO-*L. graveolens*

La temperatura es un factor importante que afecta la formación de NPs en extractos de plantas, en general, la elevación de la temperatura aumenta la velocidad de reacción y la eficiencia de la síntesis de NPs, así también conforme al aumento se favorece una mejor cristalización del ZnO, lo que conlleva a tener una mayor relación superficie/volumen con mayor cantidad de sitios reactivos responsables de mejorar la actividad antimicrobiana (Kathiravan, 2018). Respecto a la presencia de Ca en las muestras, se puede observar que los picos correspondientes (Ca) disminuyen al aumentar la temperatura de calcinación como ocurre con las NPs de ZnO-*L. graveolens* (figura 4C).

El aumento en la temperatura favorece una mejor cristalización del ZnO. Respecto a los tamaños de cristalita obtenidos se alcanzaron tamaños de 22; 23 y 25 nm a 400 °C, para cada uno de los extractos. Respecto a la presencia de Ca en las muestras, se puede observar en los patrones que los picos correspondientes a esta fase disminuyen al aumentar la temperatura de calcinación.

De igual manera, el mismo proceso térmico de calcinación (80, 200, 300 y 400°C) se aplicó para las NPs de ZnO/Ag, como se muestra en la figura 5. El resultado del patrón de difracción muestra los picos característicos del ZnO, ya discutidos anteriormente, así como la presencia de plata en reflexiones características localizadas a 38.12, 44.3, 64.46 en los planos (111), (200), (220) y (311) correspondientes a una fase de Ag metálica con estructura cristalina FCC (JCPDS No. 04-0783).

La intensidad de los picos característicos correspondiente a la plata, se incrementan al aumentar la temperatura de calcinación, como se mencionó con las NPs ZnO, adicionalmente se presenta una fase de calcio (figura 5).

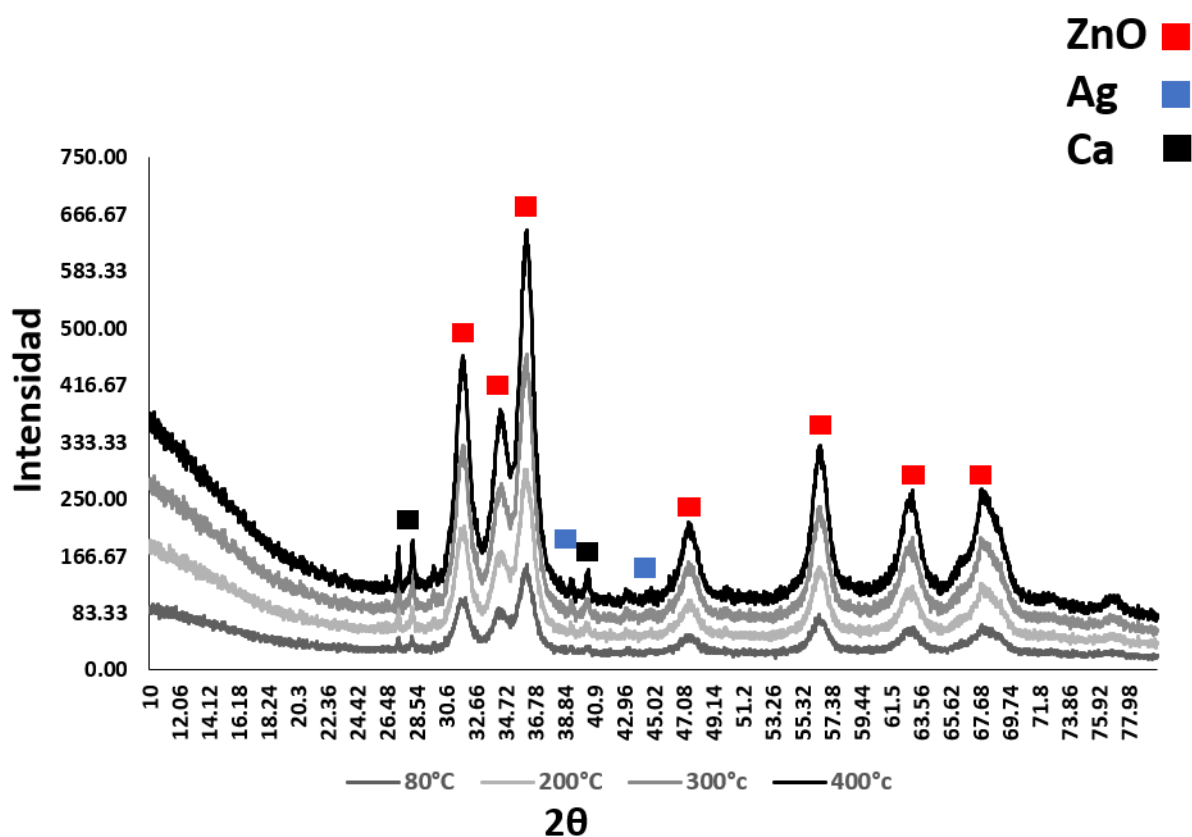


Figura 5. Difractograma de nanopartículas de ZnO/Ag sintetizadas con extracto de *F. cernua* a diferentes temperaturas de calcinación (80,200,300 y 400°C).

El estudio de Méndez-Argüello *et al.*, (2016) reportan la nula presencia de fases secundarias al realizar síntesis de NPs ZnO y ZnO+Ag 2.5% empleando ácido ascórbico como agente reductor, sin embargo, Banderia *et al.*, (2020) demostró que la síntesis de NPs ZnO empleando *Ilex paraguariensis* reducen estructuras cristalinas secundarias con forme aumenta la temperatura de calcinación, este mismo efecto se presentó con lo reportado por Muñoz-Ordoñez (2020), donde la impurezas relacionadas con el calcio en las NPs de ZnO y ZnO/Ag sintetizadas con extracto de *F. cernua* se reducen conforme al aumento de temperatura.

Los resultados de DRX citados anteriormente son similares a los obtenidos en este trabajo, ya que la presencia de fases secundarias no deseadas como el calcio, disminuyen conforme se aumentó la temperatura, al mismo tiempo que este incrementó, logró aumentar los picos característicos correspondientes al ZnO y Ag (figura 6).

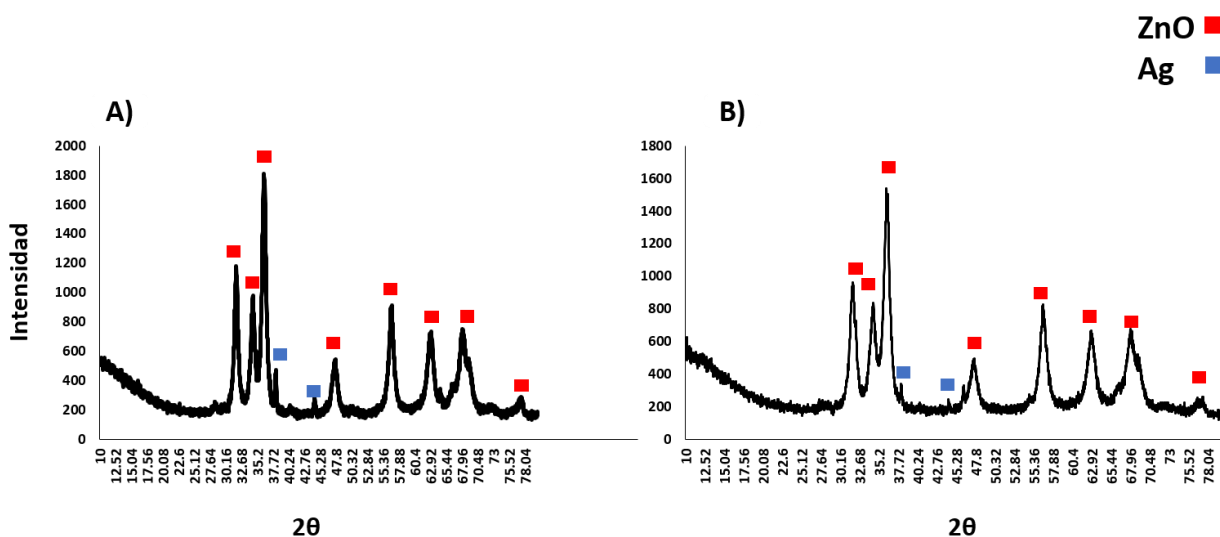


Figura 6. Difractograma de NPs ZnO/Ag sintetizadas a 400 °C de calcinación **A)** ZnO/Ag-*F. cernua* **B)** ZnO/Ag-*L. graveolens*

En un estudio de nanocompuestos de ZnO/Ag, preparados mediante el método de precipitación, se presentaron picos de difracción correspondientes a dos fases. El principal se indexo como ZnO con estructura hexagonal (JCPD No. 36-1451), mientras que el otro, correspondió a Ag metálica con estructura cúbica centrada en la cara (JCPDS No. 04-0783), lo que evidencia la formación de los nanocompuestos ZnO/Ag.

Los patrones de difracción indican que los compuestos de ZnO/Ag son cristalinos y no se observaron un corrimiento de los picos correspondientes al ZnO, lo cual indica que este óxido y la Ag están como fases individuales (Meng *et al.*, 2013). Por lo tanto, la Ag no sustituye a iones de Zn²⁺ en su estructura cristalina, solo esta como una fase independiente de los cristalitas de ZnO (Georgekutty *et al.*, 2008).

Los resultados de DRX de la literatura citados anteriormente, son similares a los obtenidos en este trabajo, donde no se presentó un corrimiento de los picos principales del ZnO y Ag en las muestras obtenidas con los diferentes extractos, mostrando que la síntesis verde con extractos de estas plantas es posible obtener nanocompuestos de ZnO/Ag para ser estudiados y buscar una oportunidad de manejo fitosanitario para importantes cultivos comerciales.

5.3 Caracterización de nanopartículas por SEM.

La morfología de las nanopartículas sintetizadas de ZnO y ZnO/Ag por los extractos de *L. graveolens*, *L. tridentata* y *F. cernua* calcinadas a 400 °C fueron obtenidas mediante el uso del microscopio electrónico de barrido (SEM) como se observa en la figura 7.

El resultado obtenido con las NPs ZnO sintetizado con extracto de *L. graveolens* (figura 7A) demuestra una aglomeración en la superficie y una la morfología irregular-circular, presentado variaciones de tamaño dentro de los aglomerados aproximado de 20 nm. Por su parte, la adición de plata al óxido de zinc en las NPs ZnO/Ag sintetizadas con *L. graveolens* (figura 7B) no generó cambios en la morfología ni en la disminución de aglomeración en la superficie de las NPs. Por su parte, la micrografía obtenida por las NPs ZnO sintetizadas con *L. tridentata* (figura 7C), demostraron tener mayor uniformidad en la morfología, siendo mayoritariamente esféricas agrupadas en aglomeraciones, las cuales indican variación de tamaño dentro de la aglomeración. Distintivamente, la adición de plata al óxido de zinc en el extracto *L. tridentata*, sí presenta una distinción en la morfología de las NPs, se observan dos formas una plana-rectangular y una morfología esférica (figura 7D). Por su parte, la micrografía

de las NPs generadas con ZnO-*F. cernua* obtuvieron una morfología esférica con presencia de aglomeraciones (figura 7E); en relación a, las NPs ZnO/Ag generadas con extracto *F. cernua* presentan forma esférica (figura 7F).

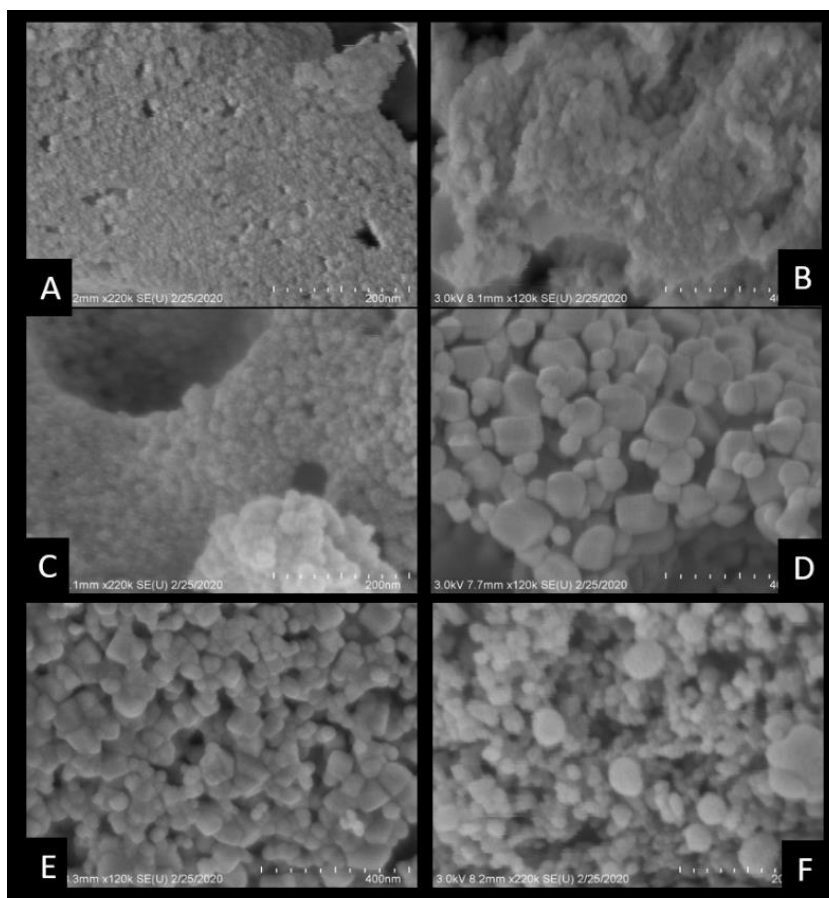


Figura 7. Micrografía de SEM de las nanopartículas de ZnO y ZnO+Ag1% asistidas con diferentes extractos de plantas. **A)** ZnO-Lp; **B)** ZnO/Ag-Lp **C)** ZnO-Lt **D)** ZnO/Ag-Lt; **E)** ZnO-Fc **F)** ZnO/Ag-Fc.

Estos resultados obtenidos a través del SEM, empleando los extractos de *L. graveolens*, *L. tridentata* y *F. cernua* como agentes reductores en la generación de NPs de ZnO y ZnO/Ag son similares conforme lo reportado en la literatura. Ahmad *et al.*, (2020) describen la morfología y tamaño del ZnO, siendo esféricas con un tamaño de 40-50 nm, las cuales se sintetizaron con extracto de *Eucalyptus globulus* y fueron observadas a través del TEM, describiendo que la aglomeración de las NPs es mayor

cuando se emplea este método (síntesis verde), debido a que la forma agrupada de las NPs confirma la presencia de desechos biológicos del extracto.

Lakshmeesha *et al.*, (2020) describió la morfología de NPs ZnO sintetizadas por *Melia azedarach* siendo hexagonales con un tamaño de 30-40 nm con agregados de NPs. Las micrografías obtenidas de las NPs, muestran en general una aglomeración en la superficie de las muestras analizadas, característica que se asimila por el uso de los extractos de plantas utilizados para su formación, las cuales producen este efecto.

5.4 Actividad antifúngica

Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum* para evaluar si el tipo de extracto de planta tienen un efecto en la capacidad antifúngica de las NPs de ZnO y ZnO/Ag. Por lo cual se realizaron ensayos bajo las mismas concentraciones de cada uno de las NPs sintetizadas. Además, se evaluó el efecto de la patogenicidad de los hongos *in vitro*, por la aplicación de las NPs ZnO y ZnO/Ag en la producción de esporas.

5.4.1 Antagonismo *in vitro* contra *Alternaria solani*

La evaluación de crecimiento de *Alternaria solani* se realizó cuando esta alcanzó el 100% de crecimiento micelial, el cual fue 7 días después de la siembra. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos por los diferentes tratamientos de NPs ZnO y NPs ZnO/Ag sobre el crecimiento del micelio. El efecto antagonista de las NPs se correlaciona con el incremento en la concentración de las mismas, por lo que, a dosis más altas (1000 mg L⁻¹) se observó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial como se muestra en la tabla 5.

Las NPs ZnO-Lg lograron inhibir el 50 % del crecimiento radial a partir de 500 mg L⁻¹, alcanzando un 65.22±0.50 % a la máxima concentración evaluada. Por otro lado, las NPs ZnO con extracto de *L. tridentata* (ZnO-Lt) lograron inhibir el 50 % del crecimiento radial a 250 mg L⁻¹, aumentando a un 63.87±0.68 % de inhibición a 1000 mg L⁻¹ (Tabla 5). Por su parte, las NPs ZnO sintetizadas con extracto de *F. cernua* (ZnO-Fc) alcanzó 60.33 ±0.29 % de inhibición de crecimiento radial a una

concentración de 500 mg L⁻¹, aumentando su efecto inhibitorio en 2 % más a una concentración de 1000 mg L⁻¹.

El mejor efecto inhibitorio de *A. solani* se obtuvo con las NPs de ZnO-Lg, a la máxima concentración (1000 mg L⁻¹). Cabe resaltar que el efecto de inhibición a la máxima concentración utilizada no presenta diferencias significativas entre los extractos empleados, puesto que todas las NPs ZnO sintetizadas presentaron un efecto de inhibición radial superior de un 60%.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Alternaria solani* por efecto de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc/plata sintetizadas con diferentes extractos de plantas *

Tipo de nanopartícula	Concentración (mgL ⁻¹)			
	150	250	500	1000
ZnO-Lg	26.1 ±1.5 D C	47.63 ±1.26 A	57.73 ±0.85 A	65.22 ±0.50 A
ZnO-Lt	27.81 ±2.02 B C D	51.46 ±0.65 A	60.46 ±0.70 A	63.87 ±0.68 A
ZnO-Fc	22.49 ±1.84 D	42.28 ±1.64 B	60.33 ±0.29 A	62.06 ±0.78 A
Adicionadas con plata al 1%				
ZnO/Ag-Lg	40.03 ±0.42 A	47.91 ±0.70 A	51.21 ±0.76 B	56.38 ±0.96 B
ZnO/Ag-Lt	31.86 ±0.32 B C	37.54 ±0.86 C	41.45 ±0.88 D	44.87 ±0.22 C
ZnO/Ag-Fc	33.85 ±1.06 A B	38.05 ±0.65 B C	45.13 ±0.86 C	44.04 ±0.59 C

*Análisis de comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) con una significancia a 0.05 niveles de probabilidad.

Sin embargo, la adición de plata a las NPs ZnO demostró incrementar la capacidad antifúngica de las NPs a bajas concentraciones (150 y 250 mg L⁻¹). Las NPs ZnO/Ag-Lg a 150 mg L⁻¹ incrementaron la capacidad antifúngica en 54.4 % (40.03 ±0.42) con respecto a las NPs ZnO sin plata (ZnO-Lg) no obstante, a concentraciones más altas evaluadas no hubo incremento de inhibición por la adición de plata. En el caso de las NPs de ZnO/Ag-Lt incrementaron en 14.5 % la capacidad antifúngica a 150 mg L⁻¹ pero al incrementar la concentración este tuvo un comportamiento negativo al disminuir el efecto antifúngico de las NPs ZnO/Ag-Lt en 29.7% a 1000 mg L⁻¹ con respecto a las NPs ZnO-Lt. Un comportamiento similar fue observado en las NPs de

ZnO/Ag-Fc, las cuales solo incrementaron la capacidad antifúngica a bajas concentraciones (150 mg L^{-1}) pero al incrementar la concentración de las NPs en el medio, disminuyó esta capacidad.

Estos resultados obtenidos son similares con lo reportado por Abdelhakim *et al.*, (2020) al obtener efectos inhibitorios de *A. solani* a partir de 200 mg L^{-1} con NPs de ZnO sintetizadas por *A. tenuissima* obteniendo mayor diámetro de inhibición a 400 mg L^{-1} . También, Ali *et al.*, (2020) reporta el control el crecimiento de *A. solani* con el uso de NPs ZnO sintetizadas por extracto de Neem en 45%. Demostrando que la aplicación de NPs de óxido de zinc genera efectos antagónicos en el crecimiento de *A. solani*.

Adicionalmente se realizó una cinética de crecimiento de *A. solani* bajo el efecto de las NPs de ZnO y ZnO/Ag sintetizadas con extractos de plantas (figura 8). La cinética de crecimiento de *A. solani* fue evaluada por 7 días consecutivos (tiempo en que este abarcó el 100% del crecimiento micelial, en el control).

Después del 3 día de siembra las NPs ZnO-Lg mostraron efecto inhibitorio en el crecimiento radial del hongo a concentraciones de 500 y 1000 mg L^{-1} , por su parte a bajas concentraciones (150 mg L^{-1}) de NPs ZnO, se presentó una inducción del crecimiento superando el crecimiento del control (figura 8A). Este efecto se puede deber al Zinc, ya que, al considerarse como un nutriente esencial de microorganismos, funciona como estimulante y no como antagónico en el crecimiento (Parveen *et al.*, 2019). Por su parte, la adición de plata al óxido de zinc (ZnO/Ag-Lp) mejoró su capacidad antagónica en el crecimiento del hongo desde bajas concentraciones (150 mg L^{-1}) como se muestra en la figura 8B, donde se aprecia que todas las concentraciones evaluadas presentan un efecto antagónico en el crecimiento a partir del tercer día con respecto al crecimiento del control.

De igual forma, las NPs de ZnO-Lt (figura 8C), generaron disminución del crecimiento a partir de concentraciones como 500 mg L^{-1} al tercer día de exposición a las NPs, siendo las concentraciones bajas (150 y 250 mg L^{-1}) estimulantes en el crecimiento del hongo, con respecto a la curva de crecimiento del control. Este efecto

se elimina, con la adición de plata al óxido de zinc con ZnO/Ag-Lt (figura 8D) donde el crecimiento de *A. solani* se ve afectado desde bajas concentraciones, inhibiendo el crecimiento a partir del tercer día de evaluación.

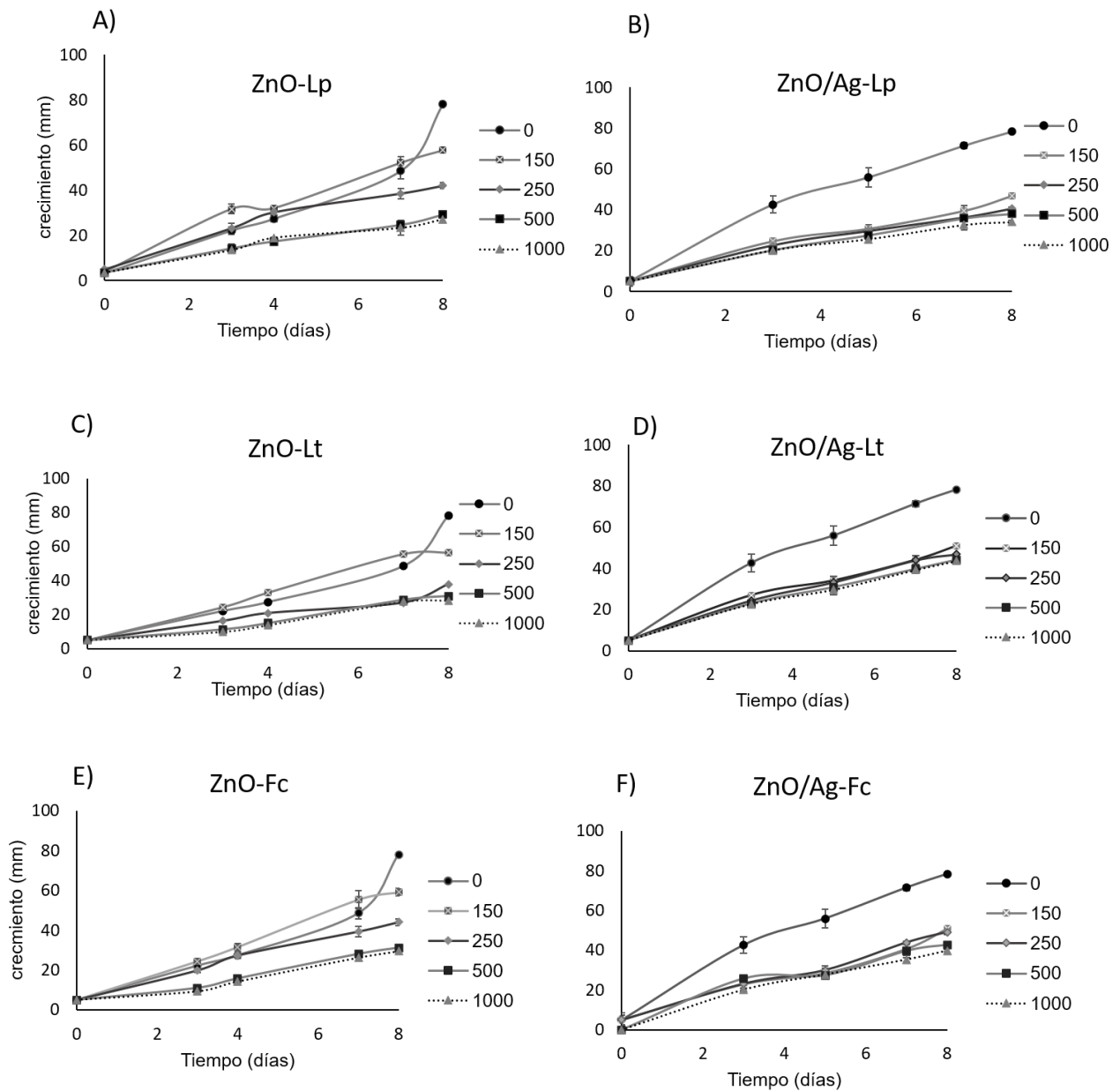


Figura 8. Cinética de crecimiento de *A. solani* bajo efecto de las nanopartículas sintetizadas por extractos de plantas **A)** ZnO-Lg **B)** ZnO/Ag-Lg **C)** ZnO-Lt **D)** ZnO/Ag-Lt **E)** ZnO-Fc **F)** ZnO/Ag-Fc

En la figura 9, se observa el efecto de inhibición el crecimiento radial de *Alternaria solani* bajo efecto de las NPs ZnO y ZnO/Ag sintetizadas con los extractos

de plantas evaluados. La aplicación de NPs ZnO sintetizadas por los extractos de *L. graveolens*, *L. tridentata* y *F. cernua* presentan mayor capacidad de inhibición de *A. solani* conforme se aumentó la concentración de NPs; el mejor efecto inhibitorio se obtuvo con las NPs ZnO sintetizados con el extracto de *Lippia graveolens* (orégano) a una concentración de 1000 mg L⁻¹ (Fig. 9A). Por su parte, la adición de plata a las Nps de ZnO benefició la capacidad antifúngica a las NPs en concentraciones bajas (150 y 250 mg L⁻¹) [figura 9B], donde se presentó un control de forma más homogénea con respecto al crecimiento de *A. solani* bajo NPs ZnO puras.

Cabe resaltar que se observa un cambio en la morfología de *A. solani* causadas por el efecto de las NPs, la literatura menciona que la aplicación de NPs ZnO en el crecimiento de los hongos, genera malformación de hifas provocando cambios en su estructura (conidios y conidióforos afectados), toxicidad producida por ROS causando daño oxidativo en la célula y respectivamente la muerte del hongo (Jyutika *et al.*, 2020; Dimkpa *et al.*, 2013; Rajiv *et al.*, 2013).

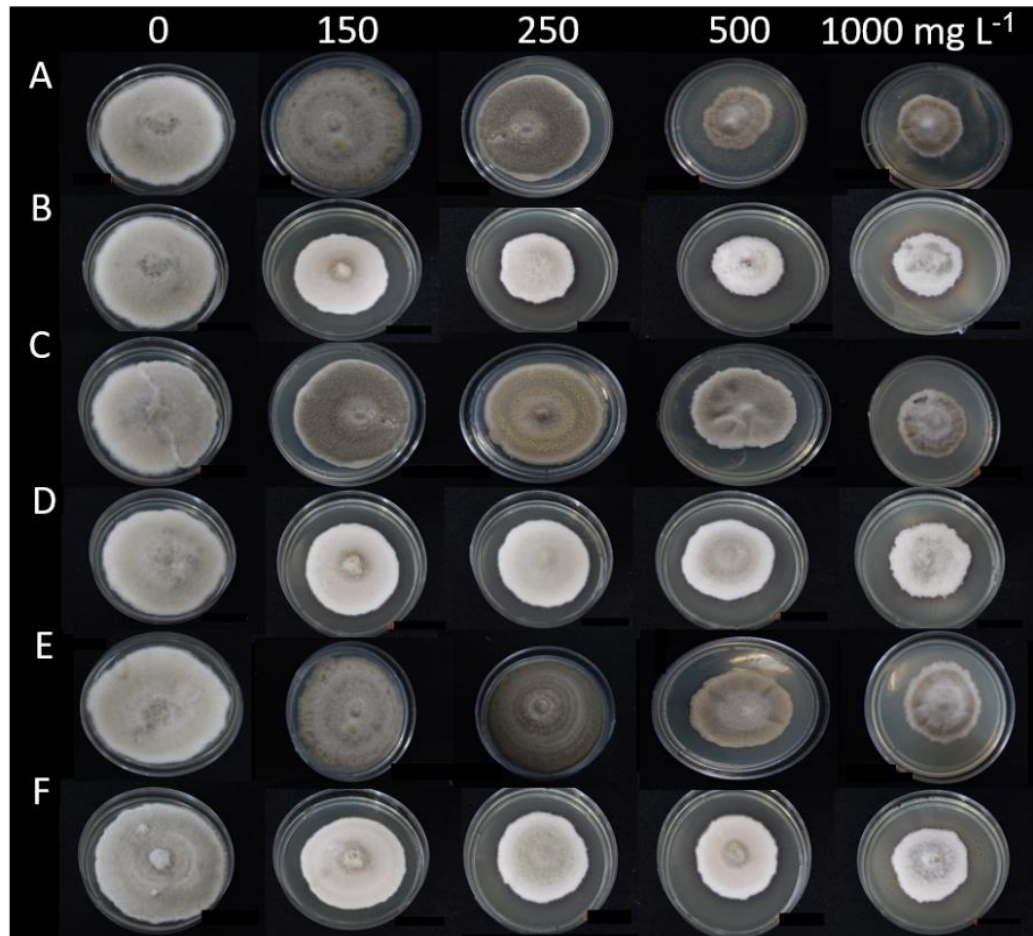


Figura 9. Efecto de las nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag asistida por diferentes extractos de plantas en el crecimiento de *Alternaria solani*. **A)** ZnO-Lp; **B)** ZnO/Ag-Lp; **C)** ZnO-Lt; **D)** ZnO/Ag-Lt **E)** ZnO-Fc; **F)** ZnO/Ag-Fc.

5.4.2 Evaluación del efecto de las nanopartículas sintetizadas en la producción de esporas de *Alternaria solani*

La evaluación del conteo de esporas de *A. solani* se realizó después que éste presentó el 100% del crecimiento micelial, el cual fue al 7.º día. Se utilizó la metodología reportado por Bustillo (2015) con un factor de dilución de 10^2 . En la tabla 6, se observa el efecto de las NPs sobre la producción de esporas de *A. solani*.

Las NPs de ZnO-Lg generó una disminución en la producción de esporas en 45% ($3 \times 10^7 \pm 0$ esporas/ml) a 500 mg L^{-1} con respecto al control ($5.57 \times 10^7 \pm 0.09$), aumentando su efecto a 1000 mg L^{-1} disminuyendo en 56% ($2.44 \times 10^7 \pm 0.006$ esporas/ml). De la misma forma, las NPs de ZnO-Lt disminuyeron la producción de esporas en 43% ($3.18 \times 10^7 \pm 0$) con respecto al control (valor de esporas del control), su efecto aumentó a la dosis más alta empleada, con un 49% ($2.88 \times 10^7 \pm 0.005$). Por su parte, las NPs de ZnO-Fc disminuyeron en 40 % ($3.32 \times 10^7 \pm 0.005$) a 500 mg L^{-1} y 45% menos de esporas a 1000 mg L^{-1} ($3.01 \times 10^7 \pm 0.006$).

Tabla 6. Efecto de las nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag sobre la producción de esporas de *Alternaria solani**

Tipo de nanopartícula	Concentración (mgL^{-1})	
	500	1000
Control	$5.57 \times 10^7 \pm 0.09$ F	
ZnO-Lg	$3.00 \times 10^7 \pm 0$ C	$2.44 \times 10^7 \pm 0.006$ C
ZnO-Lt	$3.18 \times 10^7 \pm 0$ D	$2.88 \times 10^7 \pm 0.005$ D
ZnO-Fc	$3.32 \times 10^7 \pm 0.005$ E	$3.01 \times 10^7 \pm 0.006$ E
Adicionadas con plata al 1%		
ZnO/Ag-Lg	$2.37 \times 10^7 \pm 0.02$ A	$1.79 \times 10^7 \pm 0.012$ A
ZnO/Ag-Lt	$2.57 \times 10^7 \pm 0.01$ B	$2.12 \times 10^7 \pm 0.023$ B
ZnO/Ag-Fc	$2.690 \times 10^7 \pm 0.07$ B	$1.86 \times 10^7 \pm 0.04$ A

*Análisis de comparación de medias (turkey $\alpha=0.05$) con una significancia a 0.05 niveles de probabilidad

Distintivamente, la adición de plata a las NPs ZnO demostró tener mayor efectividad al disminuir en mayor porcentaje la producción de esporas de *A. solani* (tabla 6).

Las NPs ZnO/Ag-Lg exhibieron una reducción de un 52 % ($2.37 \times 10^7 \pm 0.02$) de esporas a 500 mg L^{-1} y 68% ($1.79 \times 10^7 \pm 0.012$ esporas/ml) a 1000 mg L^{-1} con respecto al control. De igual forma, las NPs ZnO/Ag-Lt generaron un 54% ($2.57 \times 10^7 \pm 0.01$) de reducción de esporas a 500 mg L^{-1} aumentando su porcentaje a un 64% a 1000 mg L^{-1} ($2.12 \times 10^7 \pm 0.023$ esporas/ml). De la misma manera, las NPs ZnO/Ag-Fc presentó un 52% de reducción de esporas a 500 mg L^{-1} , incrementando su efecto a 1000 mg L^{-1} ($1.86 \times 10^7 \pm 0.04$),

Cabe resaltar que el efecto de las NPs ZnO y ZnO/Ag sintetizadas por los extractos de plantas, fueron capaces de disminuir la producción de esporas conforme se aumentó la concentración de las NPs, de igual forma la adición de plata al óxido de zinc, favoreció al aumentar la capacidad de disminuir las esporas de *A. solani* conforme se aumentó la concentración. Estadísticamente el mejor tratamiento para el control en la producción de esporas fue con las NPs de ZnO/Ag sintetizadas con extracto de *L. graveoloens* en las dos concentraciones evaluadas (500 y 1000 mg L^{-1}), las cuales lograron inhibir 68% la producción de esporas.

Los resultados obtenidos demuestran que la adición de plata al óxido de zinc no presentó mejores resultados en la prueba de inhibición de crecimiento radial, pero si tienen la capacidad de inhibir la producción de esporas. Estos resultados se atribuyen al tamaño de las NPs de ZnO ($<30\text{nm}$) ya que la efectividad de las NPs está directamente relacionada con el tamaño y la superficie de las NPs (Parveen *et al.*, 2019), siendo la concentración de plata 1% (p/p) una limitante para generar efectos en el crecimiento más no así en la disminución de esporas, donde a esta concentración favoreció en la disminución de esporas *A. solani*, debido a que los iones Ag^{+2} se acumulan en la membrana, penetran e interactúan con bases de nitrógeno, como resultado desnaturaliza el ADN, generando malformaciones de hifas incidiendo en la disminución de esporas (Jyutika *et al.*, 2020).

En este contexto, la concentración de plata estudiada aplicada a NPs ZnO/Ag (plata al 1%) es efectiva para controlar la esporulación del *A. solani*, más no así para reducir significativamente el crecimiento radial. Esparza-Arredondo *et al.*, (2016) describen que las NPs ZnO/Ag al 2.5% controlaron en mayor porcentaje el crecimiento radial de *A. solani* en comparación con la ZnO puras.

Se sabe que las esporas germinadas de hongos patógenos desempeñan un papel importante en la colonización e infección de plantas (Ibrahim *et al.*, 2020). Por lo tanto, la tasa de inhibición de la germinación de las esporas reduce significativamente la amenaza de los hongos patógenos. Las NPs biosintetizadas pudieron inhibir eficazmente la germinación de esporas, resultados similares han sido reportados en otros estudios (Kriti *et al.*, 2020).

5.4.3 Antagonismo *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*

La evaluación del crecimiento de *F. oxysporum* se realizó cuando la cepa alcanzó el 100% de crecimiento micelial, el cual fue al 8 día después de la siembra. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos por los distintos tratamientos con NPs ZnO y ZnO/Ag. El aumento en la concentración de NPs se correlaciona con su efecto antagónico por lo que a dosis más altas (1000 mg L⁻¹) se obtuvo mayor efecto de inhibición en el crecimiento del patógeno.

Las NPs ZnO-Lg exhibieron un efecto antagónico a partir de 500 y 1000 mg L⁻¹, inhibiendo en 36.26 ±0.97 y 62.45 ±0.51 % respectivamente, sin mostrar efecto antagónico a concentraciones de 150 y 250 mg L⁻¹, donde las NPs no tuvieron un efecto alguno en el crecimiento de *F. oxysporum*. De igual forma, la aplicación de NPs ZnO-Lt mostraron efecto inhibitorio del crecimiento radial a partir de 500 mg L⁻¹ con 46% e incrementando con la concentración a 58±1.05% con la dosis más alta. El mismo efecto se presentó con ZnO-Fc a 150 y 250 mg L⁻¹, el cual no generó control alguno sobre *F. oxysporum*, su efecto se observa a concentraciones altas, con un 55±1.31% de inhibición a 500 mg L⁻¹ aumentando a 58.47 ±0.45 % con 1000 mg L⁻¹, es un 3% más. Por su parte, la adición de plata al óxido de zinc en los tratamientos, generó mayor efecto de inhibición a bajas concentraciones, con respecto a las NPs de

ZnO puras como se muestra en la tabla 7, donde las NPs ZnO/Ag-Lp aumentó la capacidad antifúngica de las NPs desde concentraciones mínimas, alcanzando un $60 \pm 0.80\%$ a 1000 mg L^{-1} , porcentaje similar alcanzado con ZnO-Lp; los cuales estadísticamente no presentan diferencias significativas entre tratamientos.

De igual forma, las NPs con ZnO/Ag-Lt obtuvo una mejor capacidad de inhibición a una concentración de 250 mg L^{-1} con un $26.68 \pm 0.23\%$ siendo el mejor tratamiento a esta concentración. De igual manera, las NPs de ZnO/Ag-Fc demostraron tener mayor capacidad antifúngica a partir de bajas concentraciones, pero su efecto disminuyó a dosis más altas, ya que no presentó mayor efecto de inhibición en comparación con las NPs ZnO-Fc puras.

El análisis de varianza demostró que la adición de plata al ZnO no generó diferencias significativas en comparación con las NPs ZnO, solo se destaca que la adición de plata a los tratamientos ejerce un mayor control a concentraciones bajas (150 y 250 mg L^{-1}), pero el efecto se reduce conforme se aumenta las concentraciones (500 y 1000 mg L^{-1}), ya que las NPs ZnO obtuvieron mayor capacidad de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*. Por lo tanto, la aplicación de NPs de ZnO resultan ser la opción más viable económicamente, puesto que la adición de plata aumenta el costo de producción y no representa mayores efectos de inhibición que las NPs ZnO.

Tabla 7. Efecto de las nanopartículas biosintetizadas en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum**

Tipo de nanopartícula	Concentración (mgL^{-1})			
	150	250	500	1000
ZnO-Lg	0 ± 0 C	0 ± 0 D	36.26 ± 0.97 C	62.45 ± 0.51 A
ZnO-Lt	0 ± 0 C	0 ± 0 D	46.88 ± 1.15 B	58.77 ± 1.05 AB
ZnO-Fc	0 ± 0 C	0 ± 0 D	55.13 ± 1.31 A	58.47 ± 0.45 B
Adicionadas con plata al 1%				
ZnO/Ag-Lg	6.25 ± 0 A	14.81 ± 0.28 B	47.38 ± 0.95 B	60.11 ± 0.80 AB
ZnO/Ag-Lt	2.5 ± 0 B	26.68 ± 0.23 A	48.08 ± 0.65 B	53.15 ± 0.25 C
ZnO/Ag-Fc	2.5 ± 0 B	5 ± 0 C	46.9 ± 0.88 B	58 ± 0.62 B

*Análisis de comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) con una significancia a 0.05 niveles de probabilidad

La evaluación del crecimiento de *F. oxysporum* bajo el efecto de las NPs ZnO y ZnO/Ag se evaluó con una cinética de crecimiento (figura 10). La evaluación del crecimiento se tomó por 8 días consecutivos, tiempo el cual este alcanzó el 100% de crecimiento micelial.

Las NPs ZnO-Lp (figura 10A), mostraron control del crecimiento micelial a partir del tercer día de inoculación del hongo al medio de crecimiento, siendo más efectivas las NPs conforme aumentó la concentración. Por su parte, la adición de plata NPs ZnO/Ag-Lp (figura 10B) mejoró la capacidad del efecto antifúngico a partir de mínimas concentraciones, las cuales desde 150 mg L⁻¹ disminuyen la curva de crecimiento del hongo, pero no demuestran mayor efecto de control al aumentar las concentraciones con respecto a las NPs ZnO puras. De igual forma, las NPs de ZnO-Lt fueron efectivas como inhibidoras del crecimiento a partir de 500 mg L⁻¹, como se aprecia en la figura 10C.

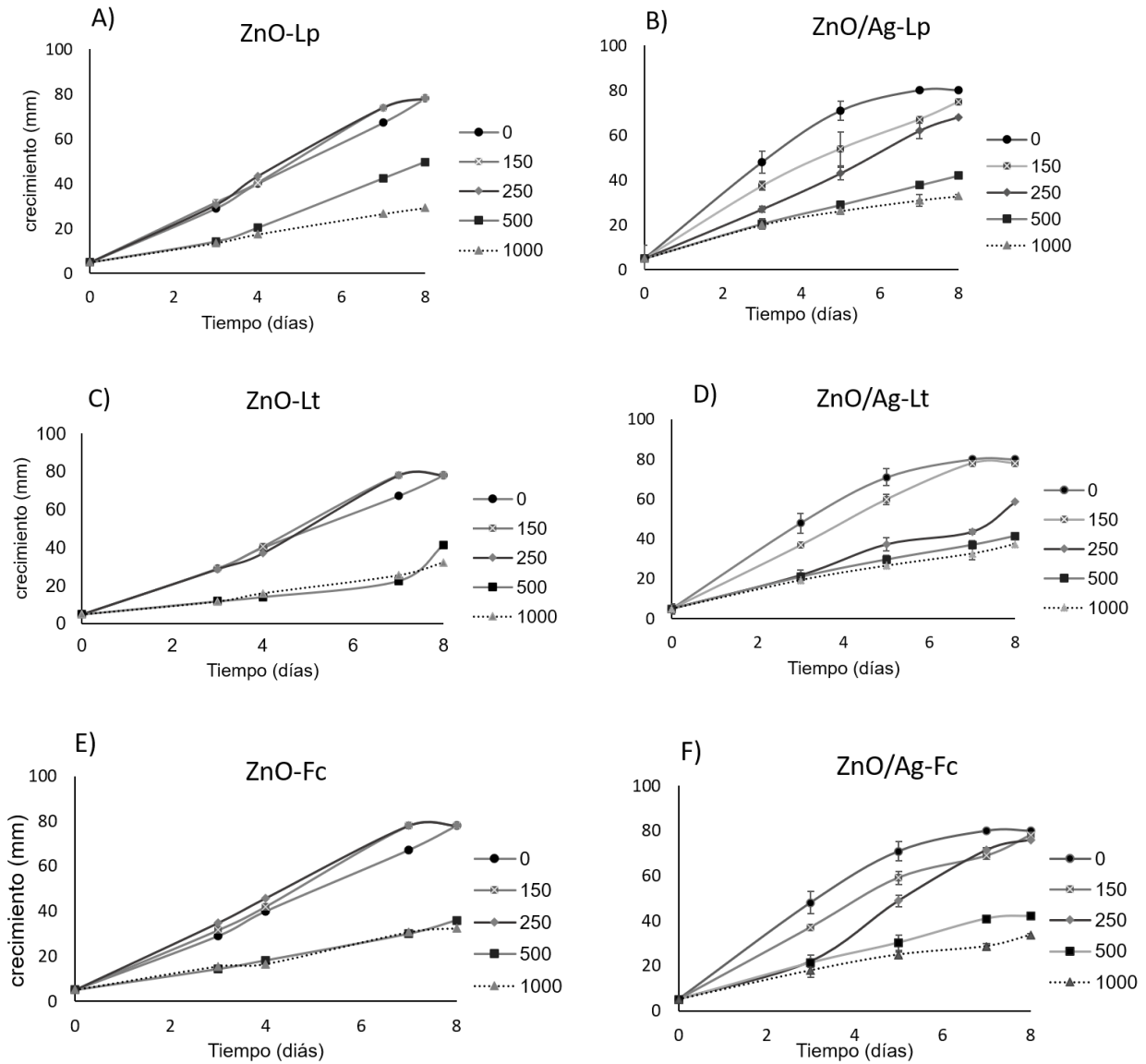


Figura 10. Cinética de crecimiento de *F. oxysporum* bajo efecto de las nanopartículas biosintetizadas con los diferentes extractos; **A)** ZnO-Lp **B)** ZnO/Ag-Lp **C)** ZnO-Lt **D)** ZnO/Ag-Lt **E)** ZnO-Fc **F)** ZnO/Ag-Fc

Por su parte, al aplicar NPs ZnO/Ag-Lt, la adición de plata mejoró la capacidad antifúngica desde concentraciones mínimas (figura 10D), pero disminuye conforme aumenta las concentraciones, siendo aún más efectivas las NPs ZnO-Lt puras para controlar el crecimiento de *F. oxysporum*.

De igual forma, las NPs ZnO-Fc exhibieron el mismo efecto de aumentar el crecimiento radial incluso por encima del control en concentraciones mínimas, las cuales, al incrementarse la concentración, presentaron un mayor efecto de inhibición

a partir del tercer día de exposición (figura 10E). Por otra parte, la adición de plata al tratamiento de ZnO/Ag-Fc mejoró la capacidad antifúngica en concentraciones mínimas, pero su efecto disminuye conforme aumenta las concentraciones, obteniendo el mismo efecto de inhibición con las NPs ZnO-Fc puras.

Cabe resaltar que los tratamientos con NPs ZnO generan un efecto antagónico en el crecimiento, cuando se aplican a concentraciones altas (500 y 100 mg L⁻¹) y a concentraciones mínimas (150 mg L⁻¹) estimulan el crecimiento del hongo aumentando incluso por encima de la curva de crecimiento del control. Este efecto se disminuye con la adición de plata, las cuales aumentan el efecto inhibitorio a mínimas concentraciones, aunque su efecto no presenta mayor capacidad antifúngica a dosis altas (500 y 1000 mg L⁻¹) donde no se diferencia una mayor capacidad antifúngica por la adición de plata, siendo aún más efectivas las NPs ZnO puras, para inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*.

Estos resultados obtenidos con las NPs ZnO en la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* son los similares con Lakshmeesha *et al.*, (2020) donde se obtuvo un efecto de inhibición para *F. oxysporum* a partir de concentraciones altas (>250 mg L⁻¹) con NPs ZnO sintetizadas con extracto de *M. azedarach* las cuales tenían un tamaño promedio de 40-30 nm, esto puede ser debido a la tolerancia que presenta *F. oxysporum* a condiciones de estrés. Por su parte, el efecto causado por la adición de plata al óxido de zinc aumentando la capacidad antifúngica a bajas concentraciones es similar con lo reportado por Esparza-Arredondo *et al.*, (2016) al obtener mayor inhibición con NPs ZnO/Ag 1.5-2.5 % desde concentraciones mínimas (150 mg L⁻¹) comparado con las NPs ZnO puras del estudio. Abdelhakim *et al.*, (2020) reportaron la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* con NPs ZnO sintetizadas por *A. tenuissima* en 17% a 400 mg L⁻¹, a concentraciones menores (100 y 200 mg L⁻¹) no presentó control alguno en el crecimiento del patógeno. El efecto antagónico de las NPs ZnO y ZnO/Ag incremento conforme la concentración se incrementó, este efecto se correlaciona con la capacidad que tiene *F. oxysporum* para tolerar concentraciones de iones metálicos en sus conidios (hipersensibilidad) evitando que la malformación de hifas se presente a mayores concentraciones (Villa-Martínez *et al.*, 2014).

En la figura 11, se observa el efecto de las NPs ZnO y ZnO/Ag biosintetizadas con los diferentes extractos de plantas a distintas dosis de concentración sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. La aplicación de NPs ZnO demostraron su efecto antifúngico a concentraciones de 1000 mg L⁻¹ al inhibir en mayor porcentaje que las NPs ZnO/Ag 1% (Fig. 11A). El efecto de la adición de plata las NPs ZnO, se observa desde concentraciones mínimas hasta concentraciones de 500 mgL⁻¹ (Fig. 2B) pero su efecto disminuye en concentraciones de 1000 mgL⁻¹.

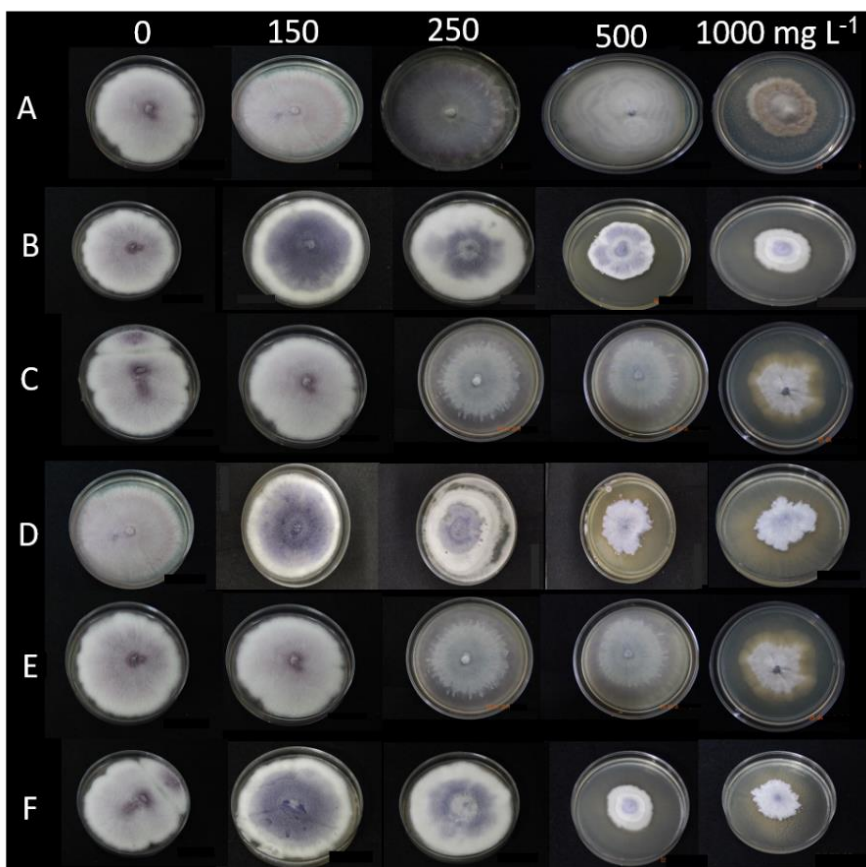


Figura 11. Efecto de las nanopartículas sintetizadas con diferentes extractos de plantas sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* **A)** ZnO-Lp **B)** ZnO/Ag-Lp **C)** ZnO-Lt **D)** ZnO/Ag-Lt **E)** ZnO-Fc **F)** ZnO/Ag-Fc.

5.4.4 Evaluación del efecto de las nanopartículas sintetizadas en la producción de esporas de *Fusarium oxysporum*

En la tabla 8, se observa el efecto de los tratamientos con NPs sobre la producción de esporas de *F. oxysporum*. La aplicación de NPs ZnO-Lg redujo la producción de esporas en un 50% ($3.63 \times 10^7 \pm 0.01$) a partir de 500 mg L^{-1} con respecto al control ($7.37 \times 10^7 \pm 0.05$) y logra inhibir su producción en 55 % ($3.33 \times 10^7 \pm 0$ esporas/ml) a 1000 mg L^{-1} . Por su parte las NPs ZnO-Lt redujeron la producción de esporas en 46% ($3.96 \times 10^7 \pm 0.12$) a 500 mg L^{-1} , pero alcanzó un 55% ($3.34 \times 10^7 \pm 0.006$) a la dosis más alta evaluada de disminución de esporas con respecto al control ($7.371 \times 10^7 \pm 0.05$).

Por su parte, las NPs ZnO-Fc generaron el mismo efecto de reducción en la producción de esporas en 50% ($3.82 \times 10^7 \pm 0.006$) menor que el control a 500 mg L^{-1} y un 55% ($3.37 \times 10^7 \pm 0.03$) a 1000 mg L^{-1} . Cabe resaltar que no hay diferencias significativas en las NPs de ZnO por la acción del extracto empleado en la síntesis, pues todas obtuvieron un 55% de inhibición a la dosis más alta evaluada.

La presencia de plata adicionada a las NPs de ZnO, demostraron tener mayor efecto en la disminución de producción de esporas. Las NPs ZnO/Ag-Lp lograron reducir en con 77% ($1.67 \times 10^7 \pm 0.03$ esporas/ml) a 1000 mg L^{-1} . Mientras que las NPs ZnO/Ag-Lt obtuvieron un 68% ($2.42 \times 10^7 \pm 0.15$ esporas/ml) y las de NPs ZnO/Ag-Fc un 67% a 1000 mg L^{-1} . Cabe señalar que la adición de plata a las NPs de ZnO, demostró tener mayor control al disminuir en mayor porcentaje la producción de esporas que las NPs ZnO, siendo aún más efectivas en el control a partir de 500 mg L^{-1} en comparación con lo obtenido a 1000 mg L^{-1} con las ZnO.

Las NPs de ZnO/Ag-Lp fue el mejor tratamiento al disminuir en mayor porcentaje la producción de esporas en las dos concentraciones evaluadas (500 y 1000 mg L^{-1} esporas/ml), estadísticamente fue el mejor tratamiento a estas concentraciones (tabla 8).

Tabla 8. Efecto de las nanopartículas biosintetizadas sobre la producción de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Tipo de nanopartícula	Concentración (mgL ⁻¹)	
	500	1000
Control	7.37x10 ⁷ ±0.05 E	
ZnO-Lg	3.63x10 ⁷ ±0.01 C	3.33x10 ⁷ ±0 C
ZnO-Lt	3.96x10 ⁷ ±0.12 D	3.34x10 ⁷ ±0.006 C
ZnO-Fc	3.82x10 ⁷ ±.006 CD	3.37x10 ⁷ ±0.03 C
Adicionadas con plata 1%		
ZnO/Ag-Lg	2.38x10 ⁷ ±0.03 A	1.67x10 ⁷ ±0.03 A
ZnO/Ag-Lt	2.56x10 ⁷ ±0.03 A	2.42x10 ⁷ ±0.15 B
ZnO/Ag-Fc	3.07x10 ⁷ ±0.16 C	2.32x10 ⁷ ±0.009 B

*Análisis de comparación de medias (turkey $\alpha=0.05$) con una significancia a 0.05 niveles de probabilidad

El efecto de las NPs ZnO y ZnO/Ag en la producción de esporas de *F. oxysporum* demostró ser eficaces al reducir en más del 50% la producción de esporas a partir de 500 mg L⁻¹, destacando las NPs ZnO/Ag con mayor eficacia al reducir en mayor porcentaje la producción de esporas que las NPs de ZnO. Este efecto se atribuye por la adición de plata a las NPs ZnO, ya que la plata (Ag⁺²), desencadena una respuesta de generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), causando daño oxidativo y modificando cambios en las hifas (Li *et al.*, 2017). Diversos estudios se han realizado evaluando el efecto antifúngico en la producción de esporas con NPs ZnO/Ag; Hameed *et al.*, (2019) aplicaron NPs ZnO/Ag sintetizadas con extractos de *S. marianum* contra *F. solani*, *A. flavus*, *A. fumigatus* teniendo mejor efecto de inhibición con las NPs ZnO/Ag a menor concentración que las ZnO. Por su parte, Godfrey y Solomon (2020), evaluaron la eficacia de NPs Ag sintetizadas con extracto de *M. oleífera* en el crecimiento de *F. oxysporum* (50, 75, 100 y 125 mg L⁻¹) generando un efecto inhibitor de esporas a partir de 100 mg L⁻¹ demostrando así que la plata tiene la capacidad para disminuir la producción de esporas de esta cepa.

Al respecto, Ali *et al* (2020) mencionan que los efectos en la disminución de esporulación de hongos se deben principalmente al tamaño de las nanopartículas y su concentración empleada, debido a que se generan mayores efectos conforme el tamaño disminuye y la concentración se aumenta causando más daños en las malformaciones de las estructuras del hongo, reduciendo su agresividad en el daño de los cultivos.

Los resultados de esta investigación demuestran que la síntesis de nanopartículas de ZnO y ZnO/Ag sintetizadas con extractos de *Lippia graveolens* (orégano), *Larrea tridentata* (gobernadora) y *Flourensia cernua* (hojasén) se pueden emplear para generar nanopartículas con un tamaño inferior a 30 nm, con un alto porcentaje de pureza, y que su efecto antifúngico para el control de hongos fitopatógenos como *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum* se logra a partir de 500 mg L⁻¹.

Cabe resaltar que las NPs ZnO y ZnO/Ag sintetizadas con el extracto de *L. graveolens* obtuvieron mejor efecto inhibitorio. Las NPs ZnO inhibieron en mayor porcentaje el crecimiento de los hongos (*A. solani* y *F. oxysporum*) mientras que las NPs ZnO/Ag mejoró la capacidad antifúngica al disminuir en mayor proporción las esporas de los hongos evaluados que las NPs ZnO puras.

Si bien, el mejor efecto de inhibición y disminución de esporas se observa con las nanopartículas generadas con el extracto de *L. graveolens*, los datos obtenidos por el uso extractos de *L. tridentata* y *F. cernua* como agentes reductores en la síntesis del óxido de zinc y plata, demuestran que de igual forma presenta control antagónico en el crecimiento y esporulación de ambas cepas evaluadas.

6. CONCLUSIONES

La síntesis de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc/plata 1% (p/p) fue posible empleando los extractos de *Lippia greveolens*, *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua*.

Las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc/plata (1% p/p) inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos: *Altaernaria solani* y *Fusarium oxysporum*. La adición de plata a las nanopartículas de óxido de zinc mejoró la capacidad antifúngica de las nanopartículas a bajas concentraciones (menores de 500 mg L⁻¹), las nanopartículas fueron capaces de inhibir la producción de esporas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhakim, H.K., El-Sayed, E. R. & Rashidi, F. B. (2020). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles with antimicrobial, anticancer, antioxidant and photocatalytic activities by the endophytic *Alternaria tenuissima*. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 1634-1646.
- Adhikari, T., Kundu, S., & Rao, A. S. (2016). Zinc delivery to plants through seed coating with nano-zinc oxide particles. *Journal of Plant Nutrition*, 39(1), 136-146.
- Agawal, H., Kumar, S. V., & Rajeshkumar, S. (2017). A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles- An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.03.002>
- Agrios, G.N. (1999). *Fitopatología*. Editorial UTEHA Noriega editores. segunda edición. Universidad de Massachusset. EUA. Pp.838.
- Agrios, G.N. (2001). *Fitopatología*. Editorial UTEHA Noriega editores. tercera edición. Universidad de Massachussets. EUA. Pp.867.
- Agrios, G.N. (2007). *Fitopatología*. Editorial UTEHA Noriega editores. quinta edición. Universidad de Massachussets. EUA. Pp.677.
- Ahmad, H., Krishan, V., Kalyanaram, R., De Brito, S., Nandini, B., Pushpalatha, H. G, Konappa, N., Nagaraja, G., & Jogaiyah, S. (2020). Green Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Eucalyptus globules* and Their Fungicidal Ability Against Pathogenic Fungi of Apple Orchards. *Biomolecules*, 10(425), 1-13.
- Ahmadi Shadmehri, A., & Namvar, F. (2020). A Review on Green Synthesis, Cytotoxicity Mechanism and Antibacterial Activity of ZnO-Nps. *International Journal of Research in Applied and Basic Medical Sciences*, 6(1), 23-21.
- Ajey, S., N. B, S., Shadma, A., Tanu, S., & Imtiyaz, H. (2017). Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, transloación

and biotransformation in plants. *J Mater Sci*, 1-17. doi:10.1007/s10853-017-1544-1.

Ajeay, S., Singh, N.B., Hussain, I., Singh, H., Yadav, V. & Singh, S.C. (2016). Green synthesis of nano zinc oxide and evaluation of its impact on germination and metabolic activity of *Solanum lycopersicum*. *Journal of Biotechnology*. 233, 84-94.

Aki, M.A, Mohammad, W. A., Nida, M. S. & Amany, O. A. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) using *Ailanthus altissima* fruit extracts and antibacterial activity. *Chemistry International*. 6(3), 151-159.

Ali, J., Mazumder, J. A., Perwez, M., & Sardar, M. (2020). Antimicrobial effect of ZnO nanoparticles synthesized by different methods against food borne pathogens and phytopathogens. *Materials Today: Proceedings*.

Ali, M, A., Ahmed, T., Wu, W., Hossain, Hafeez, R., Islam, M., Wang, Y., Sun, G. & Binli, L. (2020). Advancements in Plant and Microbe-Based Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Antimicrobial Activity against Plant Pathogens. *Nanomaterials*, 10(113), 1-24.

Amezcu Romero, J. C., & Lara Flores, M. (2017). El zinc en las plantas. *Ciencia*, 68(3), 28-34.

Andrade-Bustamante, G., García -lópez.A. M., Cervnates-Díaz, L. A., & Rueda-Puente, E.O. (2017). Estudio del potencial biocontrolador de las plantas autóctonas de la zona árida del noroeste de México: control de fitopatógenos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 49(1), 127-142.

Arbelás-Torres, G. (2001). Algunos aspectos de los hongos del género *fusarium* y de la especie *fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17(1), 11-22.

Bandeira, M., Possan, A. L., Pavin, S.S., Raota, C.S., Vebber, M. C, Giovanela, M. Roesch, E.M., Devine, J. S. (2020). Mechanism of formation, characterization

and cytotoxicity of green synthesized zinc oxide nanoparticles obtained from *Ilex paraguariensis* leaves extract. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 24, 1-15.

Boroumand Moghaddam, A., Namvar, F., Moniri, M., Azizi, S., & Mohamad, R. (2015). Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: a review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*, 20(9), 16540-16565.

Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., & Fiévet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano letters*, 6(4), 866-870.

Bustillo, A. E. (2015). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. ResearchGate, 2-15. doi:[10.13140/RG.2.1.3594.5128](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3594.5128)

Chen, B., Jiang, Y., Zhao, M., Wang, W., Chu, Z., Huo, R., Hu, F., Zhou, W., He, T., & Qian, H. (2019). Ag nanoparticles decorated hybrid microspheres for superior antibacterial properties. *Materials Letters*, 262(3), 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127057>

de Jesús Salas-Méndez, E., Vicente, A., Pinheiro, A. C., Ballesteros, L. F., Silva, P., Rodríguez-García, R., ... & Peña-Ramos, F. M. (2019). Application of edible nanolaminate coatings with antimicrobial extract of *Flourensia cernua* to extend the shelf-life of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 150, 19-27.

De León, M. Á., Sáenz, A., Jasso-Cantu, D., Rodríguez, R., Pandey, A., & Aguilar, C. N. (2013). Fermented *Flourensia cernua* extracts and their in vitro assay against *Penicillium expansum* and *Fusarium oxysporum*. *Food Technology and Biotechnology*, 51(2), 233-239.

De Rodríguez, D. J., Hérnande-Castillo, F. D., Rodríguez-García, R. & Rodríguez-Jasso, R. M. (2012). *Flourensia cernua* DC: A Plant from Mexican Semiarid Regions With a Broad Spectrum of Action for Disease Control. In *Integrated Pest Management and Pest Control-Current and Future Tactics*, 95(11), 639-650.

- De Rodríguez, D. J., Salas-Méndez, E. D. J., Rodríguez-García, R., Hernández-Castillo, F. D., Díaz-Jiménez, M. L., Sáenz-Galindo, A., González-Morales, S., Flores-López, M. L., Villarreal-Quintanilla, J. A., Peña-Ramos, F. M., & Carrillo-Lomelí, D. A. (2017). Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Industrial Crops & Products*, 107, 499-508. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.054>
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Britt, D. W., & Anderson, A. J. (2013). Antifungal activity of ZnO nanoparticles and their interactive effect with a biocontrol bacterium on growth antagonism of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Biometals*, 26(6), 913-924.
- Elmer, W. H., & White, J. C. (2016). The use of metallic oxide nanoparticles to enhance growth of tomatoes and eggplants in disease infested soil or soilless medium. *Environmental Science: Nano*, 3(5), 1072-1079.
- Enrique-Bustillo, A. (2015). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. *Researchgate* . 1-5, DOI: 10.13140/RG.2.1.3594.5128.
- Esparza-Arredondo I.E.J.; Vera-Reyes I. (2016). Potencial Antimicrobial de Nanopartículas Metálicas en Microorganismos Fitopatógenos y su Potencial como Promotores de Crecimiento en Plantas. Tesis de Licenciatura. Universidad Agraria Antonio Narro.
- Estell, R. E., Fredrickson, E. L., & Havstad, K. M. (1996). Chemical composition of *Flourensia cernua* at four growth stages. *Grass and Forage Science*, 51(4), 19-24. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1547925>
- Gahukar, R. T., & Das, R. K. (2020). Plant-derived nanopesticides for agricultural pest control: challenges and prospects. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 5(1), 3.

- Gamboa-Alvarado, R., Hernández-Castillo, F. D., Guerrero-Rodríguez, E., Sánchez-Arizpe, A., & Lira-Saldívar, R. H. (2003). Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont.(de Bary) con extractos vegetales metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* DC), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia* Ca. Schlecht). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1), 13-18.
- Georgekutty, R., Seery, M. K., & Pillai, S. C. (2008). A highly efficient Ag-ZnO photocatalyst: synthesis, properties, and mechanism. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(35), 13563-13570.
- Godfrey, O. O. & Solomon, E. O. (2020). Assessment of the in-vitro activity and in-vivo preventive efficacy of phyto-fabricated silver nanoparticles and silver nanoparticle/mancozeb combination against *Fusarium* wilt of *Lycopersicon esculentum* mill. *J. of Advancement in Medical and Life Sciences*. 8(1), 1-8.
- Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2), 75-80. doi:<https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v27>.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F. D., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V., & Jasso-Cantú, D. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*, 25(1), 48-53.
- Gutiérrez-Ortega J.A. (2004). Efecto antifúngico in vitro de *Flourensia microphylla*, *Flourensia cernua* y *Flourensia retinophylla* sobre *Alteranria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Tesis de licenciatura. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.

- Hameed, S., Khalii, A. T., Ali, M., Numan., M., Khamlich, S., Shinwari, Z. K. & Maaza, M. (2019). Greener synthesis of ZnO and Ag–ZnO nanoparticles using *Silybum marianum* for diverse biomedical applications. *Nanomedicine*. 2(7), 1-19.
- Hernández-Díaz, J.A, García-García, J. J., Zamudio-Ojeda, A., León-Morales, J. M., López-Velázquez, J. C & García-Morales, S. (2020). Plant-mediated synthesis of nanoparticles and their antimicrobial activity against phytopathogens. *Society of Chemical industry*. 1-18.
- Huiling-Zhang., Si-Chen., Xiarong-Jia., Yuxiong-Huang., Rong-Ji. & Lijuan-Zhao. (2020). Comparison of the phytotoxicity between chemically and green synthesized silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 752 (202), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142264>
- Ibrahim, E., Luo, J., Ahmed, T., Wu, W., Yan, C., & Li, B. (2020). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Onion Endophytic Bacterium and Its Antifungal Activity against Rice Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Fungi*, 6(4).
- Jamdagni, P., Poonam, K. & Rana, J. S. (2016). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University-Science*. 1-3.
- Jayarambabu, N., & Rao, K. V. (2016). *Journal of Scientific Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized From Curcuma Longa Extract for Seed Germination*, 1–6.
- Jyutika, M. R., Chikte, R.G. & Paknikar, K. M. (2020). Nanomaterials: new weapons in a crusade against phytopathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1437-1461.
- Kathiravan, V. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using different volumes of *Trichodesma indicum* leaf extract and their antibacterial and photocatalytic activities. *Research of Chemical intermediates*, 44(9), 4999-5012.
- Kriti A., Ghatak A., Mandal N. (2020). Inhibitory potential assessment of silver nanoparticle on phytopathogenic spores and mycelial growth of *bipolaris*

sorokiniana and alternaria brassicicola. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 9: 692–699. doi: 10.20546/ijcmas.2020.903.083

- Lakshmeesha, T. R., Murali, M., Mohammad-Azam, A., Udayashankar, A. C., Maadi, S. M., Nayak, C. S., & Niranjana, S.R. (2020). Biofabrication of zinc oxide nanoparticles from *Melia azedarach* and its potential in controlling soybean seed-borne phytopathogenic fungi. *Sadui Journal of Biological Sciences*, 27, 1923-1930.
- Li, J., Sang, H., Guo, H., Popko, J. T., He, L., White, J. C., Jung, G. & Baoshan, X. (2017). Antifungal mechanisms of ZnO and Ag nanoparticles to *Sclerotinia homoeocarpa*. *Nanotechnology*. 28, 1-22.
- Lira Saldivar, H. R., Méndez Arguello, B., De los Santos Villareal, G., & Vera Reyes, I. (2018). Potencial de la Nanotecnología en la Agricultura. *Acta universitaria Multidisciplinary Scientific Journal*, 28(2), 9-24. doi:10.15174/au.2018.1575
- Lira-Saldivar, R.H. (2003). Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (2), 214-22.
- Lopes, M. C & Martins, V. C. (2008). Fungal plant pathogens in Portugal: *Alternaria dauci*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 254-256.
- López-Benitez, A., López-Betancourt, S.A., Vázquez-Badillo, M.E., Rodríguez-Herrea, S. A. & Padrón-Corral, E. (2005). Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante Extractos Vegetales Acuáticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23(2), 183-190.
- Luján, C. G., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86-96.

- Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macías, M., Rivero-Cruz, I., Perez, O., & Timmermann, B. N. (2003). Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, 64(1), 285-291.
- Méndez-Arguello, B., Vera-Reyes, I., Mendoza-Mendoza, E., García-Cerda, L. A., Puente-Urbina, B.A & Lira-Saldívar, R.H. (2016). Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annum* por nanopartículas de óxido de zinc. *Nova Scientia*. 8(2), 140-156.
- Meng, A., Sun, S., Li, Z., & Han, J. (2013). Synthesis, Characterization and dispersion behavior of ZnO/Ag nanocomposites. *Advanced Powder Technology*, 24(1), 224-228.
- Mishra, V., & Sharman R. (2015). Green Synthesis of Zinc oxide Nanoparticles Using Fresh Peels Extract of *Punica granatum* and its Antimicrobial Activities. *Interntational Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 3(3), 694-699.
- Muñoz-Ordoñez, I. E., (2020). Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de zinc/plata asistida con extractos de *Flourensia cernua* DC: efecto antagónico contra *Clavibacter michiganensis* y en la germinación de semillas de tomate. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Química Aplica.
- Nadeem, A., Naz, S., Sarfraz, J., Mannan, A., & Zia, M. (2019). Synthesis, characterizations and biological activities of monometallic and bimetallic nanoparticles using *Mirabilis jalapa* leaf extract. *Biotechnology Reports*, 22,1-9. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00338>
- Novelles, M. del C. T., Rubio Ortega, A., & Pino Pérez, O. (2017). The nanoparticles from plants as a basis for the design of new antimicrobials. *Revista Cubana de farmacia*, 51(4), 1-25.
- Ogunyemi, S. O., Abdallah, Y., Zhang, M., Fouad, H., Hong, X., Ibrahim, E., ... & Li, B. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts

and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 341-352.

Orberá Ratón, T. D. L. M., Serrat Díaz, M. D. J., & González Giro, Z. (2009). Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13(2), 95-100.

Parveen, N., Nasair, A., Lubna, R., Muhammad, A. & Zabta, K. S. (2019). Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1-13pag.

Patiño-Herrera, R., Catarino-Centeno, R., Robles-Martínez, M., Moctezuma-Zarate, M. G., & Pérez, E. (2018). Antimycotic activity of zinc oxide decorated with silver nanoparticles against *Trichophyton mentagrophytes*. *Powder Technology*. 327, 381-391.

Pavón, M. Á., Gonzáles, I., Martín, R., & García, T. (2015). Importancia del género *Alternaria* como patógeno de cultivos vegetales. *Fitopatología Transferencia Tecnológica*, 46-50.

Priti-Jogee & Mahendra-Rai. (2020). Application of nanoparticles in inhibition of mycotoxinproducing fungi. *Nanomycotology*. 10, 238-250.

Rajiv, P., Rajeshwari, S., Venckatesh, R. (2013). Bio-Fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (112): 384-387

Ranjith-Reddy, P., Jayarambabu, N., Somasai, A. K., & Venkateswara, R, K. (2016). Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized from *Curcuma Longa* Extract for Seed Germination. *World Scientific Research*. 3(1), 70-74.

- Raskar, S. V. & Laware, S. L. (2014). Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Inertational Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 467-473.
- Roco, M. C., Mirkin, C. A., & Hersam, M. C. (2011). *Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020*. USA: Science Policy Reports. doi:DOI 10.1007/978-94-007-1168-6
- Rodríguez-Castro, A., Torres-Herrera, S., Domínguez-Calleros, A., Romero-García, A. & Silva-Flores, M. (2020). Extractos vegetales para el control de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, una alternativa sostenible para la agricultura. *Abanico Agroforestal*. 2(1), 1-13.
- Rodríguez-García, J. I., Ruiz-Torres, N. A., Vera-Reyes, I. & Lira-Saldivar, R. H. (2016). *Agronanotecnología: Nuevas fronteras de la revolución verde*. Saltillo, Coahuila, México. CIQA, 244-256.
- Sahayaraj, K., Geetha, B. & Chavali, M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using dry leaf aqueous extract of *Pongamia glabra* Vent (Fab.), Characterization and phytofungicidal activity. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 14, 1-7.
- Sahayaraj, K., Roobadevi, M., Rajes, S. & Azizi, S. (2015). *Vernonia cinerea* L. silver nanocomposite and its antibacterial activity against a cotton pathogen. *Research on Chemical Intermediates*, 41(8), 5495-5507.
- SEMARNAT, 2001.
<https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm>
- Shakerimoghaddam, A., Razavi, D., Rahvar, F., Khurshid, M., Moghadam Ostadkelayeh, S., Esmaeili, S. A., ... & Eshraghi, M. (2020). Evaluate the effect of zinc oxide and silver nanoparticles (ZnO-Ag NPs) on biofilm and *icaA* gene expression in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from burn wound infection. *Journal of Burn Care & Research*.

- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in biotechnology*, 34(7), 588-599.
- Subhapriya, S., & Gomathipriya, P. (2018). Green synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties. *Microbial pathogenesis*, 116, 215-220.
- Thatikayala, D., Banothu, V., Kim, J., Shin, D. S., Vijayalakshmi, S., & Park, J. (2020). Enhanced photocatalytic and antibacterial activity of ZnO/Ag nanostructure synthesized by *Tamarindus indica* pulp extract. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31(7), 5324-5335.
- Valero-Galván, J., González-Díaz, C. A., González-Fernández, (2014). Efecto de los extractos acuosos de hojas de plantas de gobernadora (*Larrea tridentata*), hojases (*Flourensia cernua*) y encino (*Quercus pungens*), sobre el crecimiento micelial in vitro de hongos fitopatógenos. *Acta universitaria*, 24(5), 13-19.
- Vijayaraghavan, K., & Ashokkumar, T. (2017). Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: a review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *Journal of environmental chemical engineering*, 5(5), 4866-4883.
- Villa-martinez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M. & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta agronómica*. 62(2), 194-205.
- Yañez-Cruz, M. G., Villanueva-Ibáñez, M., Álvarez-García, R., Flores-González, M. A., & Tovar-Jiménez, X. (2018). Efecto de nanopartículas biosintetizadas mediante extractos vegetales en el crecimiento y desarrollo de plantas de interés agrícola: adición de de AgCl/Ag a *Latuca sativa*. 42-69.

Zare, M., Namratha, K., Alghamdi, S., Mohammad Eissa, Y. H., Hezam, A., Zare, M., Drmosh, Q. A., Byrappa, K., Chandrashekar, B. N., Ramakrishna, S., y Zhang, X. (2019). Novel Green Biomimetic Approach for Synthesis of ZnO-Ag Nanocomposite; Antimicrobial Activity against Food-borne Pathogen , Biocompatibility and Solar Photocatalysis. Scientific reports, 9(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44309-w>

Zhang, C., Liu, J., Ahmeda, A., Liu, Y., Feng, J., Guan, H., Li, C., Nowrozi, M., Mohammad, M. Z., Zangeneh, A. & Almsi, M. (2020). Biosynthesis of zinc nanoparticles using *Allium saralicum* R.M. Fritsch leaf extract; Chemical characterization and analysis of their cytotoxicity, antioxidant, antibacterial, antifungal, and cutaneous wound healing properties. Applied Organometallic Chemistry, 1-18. <https://doi.org/10.1002/aoc.5564>