



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

Evaluación de la actividad biocida de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel sobre hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*.

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniero Agrónomo

AUTORES:

Cristhian Andrés Ordóñez Ramón

crsthianor-023@hotmail.es

C.I: 1105355711

Alvaro Stalin Navas Luna

alvaronavaslu1@gmail.com

C.I: 0106023799

DIRECTOR:

Blga. Denisse Fabiola Peña Tapia. Msc.

C.I: 0102501809

Cuenca, Ecuador

06/12/2021



RESUMEN

Los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. son responsables de pérdidas de rendimiento de hasta el 80% en cultivos de cereales, hortalizas, flores, frutas y productos subterráneos, resultando en serias pérdidas económicas. Las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel constituyen una herramienta importante en el desarrollo de la agricultura ecológica para el manejo sustentable de enfermedades fitopatógenas, tanto por su actividad biocida, así como por su pequeño tamaño y su gran superficie de contacto en relación con el volumen. La finalidad de la investigación fue evaluar la actividad biocida de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en forma de solución y nanofibras sobre los hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*. El presente estudio se efectuó en los laboratorios de la Universidad de Cuenca. Los ensayos se realizaron utilizando el método de difusión en pocillos de agar. El porcentaje de crecimiento micelial se registró a los 7, 14 y 21 días, a partir del establecimiento. Se encontró diferencia estadísticamente significativa del porcentaje de inhibición de crecimiento micelial en *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. Mediante los resultados se pudo determinar que las concentraciones de solución de 0.0075mg y 0.01mg y las nanofibras de 6 y 8 capas presentaron un mayor efecto inhibitor del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp.

Palabras claves: Fitopatógenos. Nanopartículas, *Fusarium* sp. *Penicillium* sp.



ABSTRACT

The phytopathogenic fungi *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.* they are responsible for yield losses of up to 80% in cereal crops, vegetables, flowers, fruits and underground products, resulting in serious economic losses. Iron and Nickel Oxide nanoparticles constitute an important tool in the development of ecological agriculture for the sustainable management of phytopathogenic diseases, both for its biocidal activity, due to their small size and their large contact surface in relation to volume. The purpose of the research was to evaluate the biocidal activity of Iron Oxide and Nickel nanoparticles in solution form and nanofibers on the phytopathogenic fungi *Penicillium sp.* and *Fusarium sp.* under in vitro conditions. The present study was carried out in the laboratories of the University of Cuenca. Assays were performed using the agar well diffusion method. The percentage of mycelial growth was recorded at 7, 14 and 21 days, from the establishment. A statistically significant difference was found in the percentage of inhibition of mycelial growth in *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.* Through the results it was possible to determine that the solution concentrations of 0.0075mg and 0.01mg and the nanofibers of 6 and 8 layers showed a greater inhibitory effect on the mycelial growth of the phytopathogenic fungi *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.*

Keywords: Phytopathogenic. Nanoparticles. *Fusarium sp.* *Penicillium sp.*



Tabla de contenido

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	8
AGRADECIMIENTOS.....	13
DEDICATORIA.....	14
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVOS.....	17
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Hongos fitopatógenos.....	18
2.1.1 Problemas ocasionados en el control de hongos fitopatógenos.....	19
2.1.2 <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium</i> sp).....	20
2.1.3 <i>Penicillium</i> (<i>Penicillium</i> sp).....	22
2.2 Antecedentes de la nanotecnología	22
2.2.1 Nanopartículas	23
2.2.2 Nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel	24
2.2.3 Nanofibras.....	25
2.2.4 Aplicaciones de las Nanopartículas en la agricultura	25
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Descripción del área de estudio	28
3.2 Metodología de investigación	28
3.2.1 Obtención de la solución de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel 28	
3.2.2 Elaboración de la nanofibras.....	29
3.3 Establecimiento de bioensayos	29
3.3.1 Reactivación de cepas de <i>Fusarium</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp.....	29
3.3.2 Bioensayos con solución de Nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel 30	
3.3.3 Bioensayos con nanofibras de Óxido de Hierro y Níquel	31
3.4 Especificación de las variables a evaluarse	32
3.4.1 Evaluación del porcentaje de inhibición	32
3.4.2 Toma de datos.....	32
3.4.3 Los métodos para el procesamiento de datos.....	32



3.5	Diseño experimental.....	33
CAPITULO IV: RESULTADOS		34
4.1	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.....	34
4.1.1	Efecto de soluciones de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp.	35
4.1.2	Efecto de soluciones de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de <i>Penicillium</i> sp.	37
4.1.3	Efecto de nanofibras de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp.	38
4.1.4	Efecto de nanofibras de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de <i>Penicillium</i> sp.	40
CAPITULO V: DISCUSIÓN		43
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		46
6.1	Conclusiones.....	46
6.2	Recomendaciones	47
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS		48
ANEXOS		60



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos con solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel con los hongos fitopatógenos <i>Fusarium</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp. en condiciones in vitro.	30
Tabla 2. Esquema de distribución al azar de los tratamientos y repeticiones de los bioensayos con solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel y los hongos fitopatógenos <i>Fusarium</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp.....	30
Tabla 3. Tratamientos con nanofibras de NPs de Óxido de Hierro y Níquel con los hongos fitopatógenos <i>Fusarium</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp. en condiciones in vitro.	31
Tabla 4. Esquema de distribución al azar de los tratamientos y repeticiones de los bioensayos con capas de nanofibras de NPs de Óxido de Hierro y Níquel y los hongos fitopatógenos <i>Fusarium</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp.....	31
Tabla 5. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para la variable PICM de los hongos <i>Fusarium</i> sp y <i>Penicillium</i> sp. en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.	34
Tabla 6. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para la variable PICM de <i>Fusarium</i> sp y <i>Penicillium</i> sp. en respuesta a los diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.....	34
Tabla 7. Análisis de Varianza para el Diseño Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo considerando la variable PICM de <i>Fusarium</i> sp. con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.....	35
Tabla 8. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Miceliar (PICM) de <i>Fusarium</i> sp. en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel evaluados en tres diferentes tiempos.	36
Tabla 9. Análisis de Varianza para el Diseño Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo, considerando la variable PICM de <i>Penicillium</i> sp. con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.....	37
Tabla 10. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Miceliar (PICM) de <i>Penicillium</i> sp. en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel evaluados en tres diferentes tiempos.....	37
Tabla 11. Análisis de Varianza para el Delineamiento Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo, considerando la variable PICM de <i>Fusarium</i> sp. sometida a diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.....	39
Tabla 12. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Miceliar (PICM) de <i>Fusarium</i> sp. en respuesta a los diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.....	39
Tabla 13. Análisis de Varianza para el Diseño Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo, considerando la variable PICM de <i>Penicillium</i> sp. sometida a diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.....	40
Tabla 14. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Miceliar (PICM) de <i>Penicillium</i> sp. en respuesta a los diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.....	41



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del presente estudio en la provincia de Azuay.	28
Figura 2. Esquema del Electrospinning.	29
Figura 3. Inhibición del crecimiento micelial a los 21 días con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Niquel en Fusarium sp. (E) Tratamiento con concentraciones de solución de NPs. (E1) Tratamiento control. (F) Tratamiento con capas de nanofibras. (F1) Tratamiento control.....	42
Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial a los 21 días con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Niquel en Penicillium sp. (G) Tratamiento con concentraciones de solución de NPs. (G1) Tratamiento control. (H) Tratamiento con de nanofibras. (H1) Tratamiento control.	42



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

NPs: Nanopartículas

NT: Nanotecnología

PLA: Ácido poliláctico

DMS: Dimetilsulfóxido

MC: Diclorometano

PDA: Papa Agar Dextrosa

PICM: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelar

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Alvaro Stalin Navas Luna en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad biocida de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel sobre hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 06 de Diciembre del 2021

Alvaro Navas

Alvaro Stalin Navas Luna

C.I: 0106023799



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Cristhian Andrés Ordóñez Ramón en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad biocida de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel sobre hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 06 de Diciembre del 2021

Cristhian Andrés Ordóñez Ramón

C.I: 1105355711



Cláusula de Propiedad Intelectual

Alvaro Stalin Navas Luna, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad biocida de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel sobre hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 06 de Diciembre del 2021

Alvaro Navas L.

Alvaro Stalin Navas Luna

C.I: 0106023799



Cláusula de Propiedad Intelectual

Cristhian Andrés Ordóñez Ramón, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad biocida de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel sobre hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 06 de Diciembre del 2021

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Cristhian Andrés Ordóñez Ramón

C.I: 1105355711



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra tutora Blga. Denisse Peña, quien nos dio la oportunidad para desarrollar este tema importante de investigación, fue quien nos brindó sus conocimientos y su ayuda para sacar adelante esta investigación.

A la Ing. Diana Curillo, quien nos apoyó constantemente y nos brindó sus conocimientos en el desarrollo de la investigación, fue parte importante que colaboró en el proceso de realización del presente trabajo.

A la Ing. Diana Brazales, quien nos apoyó y aportó con sus conocimientos en la ejecución de este trabajo de investigación.

Al Dr. Christian Cruzat, por ser parte importante del proyecto, fue quien nos otorgó los recursos necesarios para cumplir con la investigación.

Al Ing. Pablo Castro, quien fue nuestro instructor en una fase importante de nuestra investigación.

Finalmente, un agradecimiento cordial a todas las personas quienes de una u otra forma mostraron interés en este tema realizado.

Cristhian & Alvaro



DEDICATORIA

Dedicada a Dios, por permitirme sonreír a todos mis logros alcanzados, a mi madre por el apoyo incondicional en cada momento de mi vida y por ser un pilar fundamental en mi formación académica, a mi hermana por su apoyo y compañía en cada momento compartido, y a todos mis familiares, amigos, compañeros y docentes quienes creyeron en mí.

Cristhian Ordóñez R.

A Dios por siempre guiar mi camino y bendecirme. A mi familia por estar a mi lado en los momentos más difíciles e inculcarme la disciplina, la perseverancia, que cada día se puede mejorar y luchar por nuestros sueños. Solo tengo palabras de agradecimiento con todas las personas que estuvieron conmigo desde el primer momento, también a todas las personas que en el camino me dieron la mano.

Alvaro Navas L.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La agricultura es la columna vertebral de la mayoría de los países en desarrollo y la mayoría de sus habitantes depende de ella para su sustento (Pino et al., 2018). Uno de los problemas más críticos que enfrenta la agricultura es la búsqueda de soluciones en la lucha contra los microorganismos patógenos (Choudhary et al., 2017).

Los hongos son responsables de las enfermedades más dañinas en las plantas, se estima que alrededor del 85% de todas las enfermedades de las plantas son de naturaleza fúngica (Sharma et al., 2017). Los hongos fitopatógenos causan pérdidas significativas en la producción mundial de cultivos cada año (Zhang et al., 2020), son responsables de las pérdidas económicas derivadas principalmente de la reducción del rendimiento de los cultivos, de la disminución de la calidad y la seguridad del producto, lo que representa una gran amenaza para la seguridad alimentaria mundial (Di Liberto et al., 2019).

Penicillium sp. es el patógeno más destructivo al deteriorar cereales, frutas y otros alimentos, siendo el responsable de las pérdidas totales de cultivos durante el almacenamiento, empaque, transporte y comercialización (Macarisin et al., 2007). También *Fusarium* sp. es un patógeno importante de numerosos cultivos y plantas ornamentales de importancia agrícola y económica, es el principal agente causal de la enfermedad conocida como marchitamiento vascular, es el responsable de pérdidas significativas en el rendimiento de los cultivos y puede permanecer en el suelo y en los residuos vegetales por décadas, inhabilitando su uso (Ploetz, 2015).

A lo largo de los años, el control de microorganismos se ha realizado con agroquímicos, sin embargo, muchos de estos productos químicos pueden representar un riesgo para la salud humana (Kilani et al., 2016). El uso excesivo de fungicidas sintéticos, han generado la aparición de cepas resistentes a los fungicidas tradicionales, lo que ha derivado en un incremento en el uso y desarrollo de sustancias aún más tóxicas (Rubina et al., 2017). Por ello, es importante adoptar diferentes técnicas de control de estos patógenos,



especialmente con prácticas amigables con el medio ambiente (Juárez et al., 2010).

El uso de nuevas tecnologías está adquiriendo cada vez más protagonismo en la vida diaria, un ejemplo de ello es la nanotecnología o ciencia a nanoescala, que ha generado datos cuantificables (Duhan et al., 2017) contra las enfermedades fúngicas de las plantas, principalmente por las aplicaciones de nanopartículas metálicas (Saharan et al., 2015), debido a su gran área superficial, la cual entra en contacto con los microorganismos y su elevada relación superficie/volumen mejora la interacción de la actividad antifúngica frente a los microorganismos patógenos, y varios metales a escala nanométrica presentan propiedades biocidas (Rai et al., 2008). Las NPs han sido evaluadas en múltiples ensayos y han demostrado inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos como virus, hongos y bacterias (Thul et al., 2013), demostrando el enorme potencial que tienen para formular nuevos y avanzados agentes antimicrobiales (Ávila et al., 2020).

En la presente investigación se evaluó las propiedades de las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel como un agente biocida sobre *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. en condiciones *in vitro*, de esta manera se centró la investigación en esta fase de laboratorio, para proporcionar información relevante en el control de estos patógenos, que posteriormente puede ayudar a definir dosis y formas de aplicación para ser evaluadas de forma directa en los cultivos o en poscosecha, con el fin de disminuir el uso de estrategias tradicionales de protección de los cultivos que a menudo resultan insuficientes.



OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biocida de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en los hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*.

1.1.2 Objetivos específicos

- I. Determinar la concentración de nanopartículas, tanto en solución como en nanofibras, con mayor efecto en el control de *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.
- II. Valorar cuál de las formas de aplicación (solución/nanofibras) tiene un mayor efecto en el control de *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hongos fitopatógenos

Los hongos se encuentran entre los agentes causales dominantes de las enfermedades de las plantas, representan probablemente el grupo más diverso de amenazas ecológica y que causan pérdidas económicamente importantes (Sharma, 2021).

Los hongos fitopatógenos producen enfermedades en pre y poscosecha, en los cultivos de cereales, hortalizas, frutas y productos subterráneos, la rápida capacidad de reproducción de los hongos fitopatógenos es difícil de controlar y son responsables de pérdidas económicas cuantiosas (Savary et al., 2012). El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, también, a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Ramírez et al., 2008). Algunas fuentes estiman que las pérdidas son del orden de 5 - 25% en países desarrollados y 20 - 50% en países en desarrollo (Rivera, 2008), y en consecuencia, aumentan los costos de producción (Juárez et al., 2010).

Los hongos fitopatógenos varían según las prioridades científicas y económicas de cada región geográfica, algunos de ellos constituyen altos riesgos para la seguridad alimentaria y otros hongos fitopatógenos son modelos de estudio en temas relacionados a la inmunología, factores epidemiológicos y genética en plantas (Dean et al., 2012).

Hay alrededor de 8000 especies de hongos que causan enfermedades en las plantas, gran parte de los hongos fitopatógenos pasan la mayoría de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped, y otra parte en el suelo, específicamente en los residuos vegetales como saprófitos (Juárez et al., 2010). Para una invasión exitosa de los órganos de las plantas, los hongos fitopatógenos desarrollaron estructuras de infección especializadas y fuertemente reguladas, utilizan diversas estrategias para colonizar y causar enfermedades (Gómez & Rodríguez, 2012).



El daño causado por los hongos fitopatógenos es una muerte del tejido que infectan llamada necrosis, afectan la raíz, o bien el sistema vascular de la planta, tienden a producir color amarillo en la planta y marchitez (Martínez & Ramos, 2019). Los daños ocasionados provocan atrofia, disminución de la vitalidad de las plantas y de los órganos infectados, lo que puede llevar a la muerte de la planta, o hacerla improductiva (Martínez & Ramos, 2019). Estos daños son más graves cuando la humedad y la temperatura son elevadas (Agrios, 2011).

Las pérdidas económicas debidas al ataque de los hongos fitopatógenos superan los U\$S 200.000 millones anuales y se invierten cada año cerca de U\$S 6.000 millones en protección de cultivos contra enfermedades fúngicas, y en Ecuador se reportó un gasto promedio de U\$S 120 por ha, lo que representa un 10% de los costos de producción (Agrobiotecnología, 2013).

2.1.1 Problemas ocasionados en el control de hongos fitopatógenos

El control químico de patógenos es una de las medidas de manejo más utilizadas dentro de la agricultura moderna, los fungicidas se han ido constituyendo en una parte integral de la producción eficiente de alimentos (Hollomon & Ishii, 2015), sin embargo, el uso de fungicidas puede tener efectos adversos, incluida su toxicidad residual que representa un severo riesgo para los seres humanos y los organismos, contribuye al aumento de la contaminación del medio ambiente, requiere un largo período de degradación y se acumula en la cadena alimentaria (Mongkol et al., 2016).

La utilización de fungicidas es una herramienta eficiente, rápida, práctica, y económicamente viable para el control de patógenos, sin embargo, las especies de hongos en muchas ocasiones pueden generar resistencia, tornando a los ingredientes activos de los insumos fitosanitarios ineficientes, generando graves complicaciones a los productores, empresas y a la comunidad en general (Hollomon & Ishii, 2015). La vida útil o efectiva de un fungicida sintético, se define como el período de tiempo que va desde el inicio de uso en un cultivo, en una región, cuando se lanza al mercado, hasta que el mismo pierde el control efectivo de campo de la enfermedad que se pretende controlar (Hobbelen et al., 2013), el surgimiento de cepas resistentes a los diferentes principios activos que contienen los fungicidas sintéticos, es uno de los aspectos más importantes de



la agricultura actual, e implican un aumento en los costos de producción para controlar estos patógenos y generan pérdidas económicas y biológicas (Lucas et al., 2015).

El control biológico para combatir las enfermedades en las plantas es actualmente pequeño, representando el 1% del porcentaje de ventas de compuestos químicos (Fravel, 2005), la mayoría de estos productos presentan problemas de efectividad en el control del patógeno, en general menor que los productos químicos (Sempere & Santamarina, 2008). El uso comercial y la aplicación del control biológico de enfermedades han sido lentos, principalmente por sus rendimientos variables bajo diversas condiciones ambientales en el campo (Sharma, 2021), y generalmente su acción no es inmediata, por lo que estos productos se encuentran supeditados a las condiciones medioambientales y en numerosas ocasiones no alcanza un efecto suficiente para reemplazar a los productos químicos en su totalidad, por lo tanto, no es rentable para ciertos mercados, por el largo proceso de formulación y porque el coste de registro y los estudios de toxicidad son excesivamente caros (Valdés, 2014).

Las perspectivas futuras del control biológico de las enfermedades de las plantas son brillantes y prometedoras, el uso de biotecnología y nanotecnología para mejorar los mecanismos de biocontrol, aumentar el rendimiento, proteger el medio ambiente y los recursos biológicos, son necesarios para abordar una agricultura sostenible (Sharma, 2021).

2.1.2 Fusarium (*Fusarium* sp)

El género *Fusarium* es un gran grupo de hongos filamentosos, ampliamente distribuido en todo el mundo debido a su gran facilidad de propagación en agua, viento y suelo, está asociado con plantas en todo el mundo (Lombard et al., 2019). Es un género cosmopolita con la capacidad de sobrevivir como saprófitos en el suelo o como huésped en las plantas (Srivastava et al., 2018).

El género *Fusarium* ataca a más de 80 cultivos de importancia agrícola comercial, las especies *F. oxysporum* y *F. solani* son las más relevantes para los cultivos de hortalizas (Tapia & Amaro, 2014), provoca pérdidas de rendimiento entre 21 y 47% y de hasta el 80% tanto en cultivos de campo abierto como en



cultivos de invernadero, tiende a afectar una gran cantidad de cultivos como flores, hortalizas, frutales, gramíneas y ornamentales (Villaverde, 2018).

Especies de este género son responsables de diversas alteraciones vegetales, incluyendo marchitez, pudrición de raíces y tallos (Aguirre et al., 2019). *Fusarium* sp. ocasiona mal del talluelo en plántulas ya sea en semillero o a campo abierto, esto se debe por la pérdida de lignina en el tallo, haciéndolas más susceptibles, permitiendo que el patógeno alcance rápidamente los vasos del xilema, causando la destrucción y el colapso del tejido (Agrios, 2005). El tejido vascular de una plántula enferma es de color pardo oscuro y es más notable en el punto de unión del peciolo con el tallo, siendo característico de la enfermedad (Vásquez & Castaño, 2017).

En plantas adultas, el ataque de *Fusarium* se denomina como marchitez vascular, las mismas muestran amarillamiento, que empieza por las hojas bajas y por lo general mueren, en ocasiones, las hojas presentan marchitez en los folíolos de un lado del peciolo, mientras que los del lado opuesto se ven sanos y la marchitez del follaje es más notable después de la floración y cuajamiento de los frutos (Vásquez & Castaño, 2017).

Fusarium es un fitopatógeno importante para las plantas de banano, papa y trigo, entre otras, y causa un gran número de pérdidas económicas en la agricultura cada año (Srinivas et al., 2019). La notoria enfermedad de Panamá del banano (*F. oxysporum* f. Sp. *Cubense*), es una de las enfermedades de las plantas más importantes a nivel mundial, responsable de millones de dólares en pérdidas para los agricultores y quizás incluso amenazando la existencia del cultivo (Ploetz, 2015).

Especies de *Fusarium* como *F. oxysporum* y *F. solani* son consideradas como los principales agentes causales de marchitez vascular, y junto a géneros como *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phythium* sp., han sido considerados como un complejo fitopatogénico que, en condiciones favorables originan la enfermedad y provocan grandes pérdidas económicas al afectar del 60 al 100% de la superficie cultivada (Villa et al., 2015).



2.1.3 *Penicillium* (*Penicillium* sp)

Penicillium es uno de los hongos más comunes que se encuentran en una amplia gama de hábitats, su función principal en la naturaleza es la descomposición de materiales orgánicos, donde las especies causan putrefacciones devastadoras antes y después de la cosecha de los cultivos (Visagie et., 2014).

Penicillium son mohos comunes que se desarrollan sobre los más diversos sustratos, granos, paja, frutas y hortalizas en general (Carrillo, 2006). El *Penicillium* es un hongo que puede encontrarse distribuido en todo el mundo, se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides, y sus colores típicos varían de azul a azul-verde (Juárez et al., 2010).

Especies de *Penicillium* sp. producen la podredumbre azul y verde por mohos de los frutos cítricos y la podredumbre azul por mohos de las manzanas, uvas, peras y frutas con hueso, y es de fácil proliferación en los alimentos (Juárez et al., 2010). El principal hospedero de *Penicillium* son los cítricos en la poscosecha siendo el causante de la podredumbre verde, también se lo puede encontrar en fresa (Acosta, 2013).

Las especies de *Penicillium* sp. originan importantes pérdidas al deteriorar cereales, frutas y otros alimentos durante su almacenamiento, muchas especies del género pueden producir el deterioro de diferentes alimentos a bajas temperaturas, significando un problema para alimentos que se conservan en refrigeración y en el almacenamiento de frutas, al tratarse de productos frescos, puede presentar importantes pérdidas debido al crecimiento de *Penicillium* sp. (Martinez, 2003). *Penicillium* puede llegar a causar pérdidas de hasta el 80% en la poscosecha (Rodríguez, 2008).

2.2 Antecedentes de la nanotecnología

La Nanotecnología (NT) ha estado presente en la civilización desde la antigüedad y con el paso del tiempo ha ido creciendo a pasos agigantados, manteniéndose hasta la fecha. Se define como la tecnología basada en el estudio y la manipulación de la materia en un rango de dimensiones de nanoescala, usualmente entre 1 y 100 nm (Hulla et al., 2015). La nanotecnología



se aplica ampliamente en nuestra vida cotidiana y está cambiando a toda la sociedad, ha comenzado a entrar en la industria agrícola y alimentaria desde 2003 (USDA, 2003). La investigación sobre este tema se ha disparado durante la última década, cubre casi todos los aspectos de la industria alimentaria y agrícola, incluida la agricultura, la irrigación/filtración de agua, el procesamiento y envasado de alimentos, la alimentación animal y la acuicultura (Peters et al., 2016).

La aplicación de la NT en la agricultura hoy en día están recibiendo mucha atención, gracias a sus beneficios potenciales, los mismos que incluyen la mejora en la calidad e inocuidad de los insumos agrícolas (Dasgupta et al., 2014), para aumentar la producción de cultivos (Oliveira et al., 2015). La mayor inversión en NT se encuentra en los países desarrollados, los avances de investigación prometen una visión de grandes aplicaciones en la agricultura, en especial para zonas marginadas, que podría tener un impacto significativo en las poblaciones rurales de los países en desarrollo (Prasad et al., 2014).

El sector agrícola afronta una amplia variedad de desafíos como el bajo rendimiento de los cultivos, la baja eficiencia en el uso fertilizantes químicos, la disminución de materia orgánica del suelo, el cambio climático, la acumulación de los pesticidas y fertilizantes en el productos agrícolas y el ataque de plagas y enfermedades (Shiva, 2016). Para hacer frente a estos desafíos, la NT ofrece una posible solución para explorar el uso de diversos tipos de nanomateriales, que tiene como finalidad preservar los cultivos del ataque de microorganismos patogénicos (Echegoyen & Nerín, 2013), además, otro tipo de nanosensores permiten entregar la cantidad correcta de nutrientes y plaguicidas de manera precisa, lo que promueven la productividad sustentable mediante el uso de diversos tipos de NPs (Subramanian et al., 2015).

2.2.1 Nanopartículas

Son sinónimo de un subgénero del amplio campo de la nanotecnología y comprenden cualquier tipo de partículas naturales o artificiales, cuyo confinamiento espacial es menor a los 100 nanómetros, indetectables por el ojo humano, pueden exhibir propiedades físicas y químicas significativamente diferentes a sus contrapartes materiales más grandes (Thomas et al., 2015).



Debido a su tamaño muy pequeño, las nanopartículas tienen una relación de superficie a volumen muy grande, esta característica permite que las nanopartículas posean propiedades ópticas, físicas y químicas inesperadas, ya que son lo suficientemente pequeñas (Jarvie et al., 2019). Las nanopartículas también son llamadas nanopolvos, nanofibras, nanocristales y puntos cuánticos (López et al., 2016).

Las nanopartículas se sintetizan mediante métodos físicos, químicos o biológicos, varios métodos físicos y químicos requieren equipo especial y mano de obra calificada (Virkyte & Varma, 2011). Hoy en día, las NPs son un área extensa de investigación científica, debido a una amplia gama de aplicaciones, en los campos de la industria de alimentos, producción agrícola, tratamiento y remediación de aguas, monitorización de la salud, detección y control de plagas y enfermedades (Palencia & Combatt, 2013).

2.2.2 Nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel

Las partículas de Óxidos de Hierro y Níquel son de gran interés, especialmente en el estudio de sus propiedades magnéticas, debido a sus aplicaciones prácticas y versátiles (Tkach et al., 2015), tienen una mayor importancia por su amplia gama de aplicaciones en diferentes campos debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, estas NPs magnéticas cuando se sintetizan se vuelven biocompatibles y ecológicas (Mohammed et al., 2017; Do Cuoto, 2006), ganando un creciente interés en los campos de la nanociencia y nanotecnología (Mesquida et al., 2017), por su tamaño de partícula y forma ingenieril, presentan gran importancia, además son ampliamente estudiados debido a su bajo costo, y utilidad como agente antimicrobiano ya que no son tóxicos (Corredor & Echeverría, 2007). La importancia de la actividad biocida de estas NPs constituye una herramienta importante en el desarrollo de la agricultura ecológica para el manejo de enfermedades fitopatogénicas (Ul Haq & Ijaz, 2019), su importancia es atribuida a su pequeño tamaño y su gran superficie de contacto en relación al volumen, aplicándose en áreas muy localizadas que podrían reducir el daño en otros tejidos de la planta, y a la vez reduciendo de manera importante el efecto adverso al medio ambiente (Srilatha, 2011).



2.2.3 Nanofibras

Son fibras con diámetros en un rango de nanómetro, pueden ser generadas a partir de diferentes polímeros, debido a que se aplican en una amplia variedad de campos industriales y presentan un futuro prometedor (Kohsari et al., 2015). Hay diferentes procesos para generar nanofibras, pero la técnica de Electrospinning o electrohilado, es ampliamente estudiada gracias a la posibilidad de crear fibras en escala micro y nanométrica, para una gran variedad de aplicaciones, resultando atractivo a nivel biotecnológico (Sánchez et al., 2013).

La técnica de Electrospinning consta de tres componentes principales, una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos, los cuales son conectados a la salida de la aguja metálica y otro directo al plato colector, para impulsar la solución del polímero a través del capilar hacia la placa colectora, se utiliza una bomba de infusión, la tensión superficial de la gota que se forma en el extremo de la aguja es vencida por la fuerza del campo eléctrico, la gota se distorsiona formando el cono de Taylor, esta distorsión provoca la expulsión del polímero cargado eléctricamente en dirección al colector formando hilos delgados (Gonzales et al., 2020).

Las nanofibras son una plataforma adecuada para fabricar nuevos materiales antimicrobianos, debido a sus características, las que incluyen pequeñas dimensiones, alta área de superficie específica, porosidad y alta flexibilidad funcional de la superficie (Viñanzaca, 2019). Las nanofibras provienen principalmente de polímeros biodegradables como ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), y óxido de polietileno (PEO); de igual forma se ha realizado electrospinning con polímeros naturales como quitosano, colágeno, ácido hialurónico, celulosa, seda y otros materiales (Gonzales et al., 2020).

2.2.4 Aplicaciones de las Nanopartículas en la agricultura

Las nanopartículas se emplean para el desarrollo de fertilizantes, plaguicidas, reguladores de crecimiento, monitoreo de las condiciones ambientales en los cultivos, como humedad, temperatura y niveles de nutrientes (Kah, 2015). En otras aplicaciones se considera la utilización de nanomateriales para la



estabilización de bioplaguicidas (Chen & Yada, 2011). Según Hayles et al. (2017) el uso de NPs en la agricultura se está investigando en nanocódigos de barras, nanosensores, germinación de semillas, transporte de hormonas en plantas, transferencia de genes, manejo del agua y manejo de enfermedades de las plantas.

Las NPs se utilizan en muchos campos en la agricultura, para mejorar la eficiencia de los agroinsumos y para reducir significativamente las cantidades de productos por aplicar, y el uso principal de las NPs metálicas en la agricultura e industria alimentaria, se debe principalmente a su actividad antimicrobiana (Singh et al., 2015), también, sus aplicaciones intervienen en la entrega de biomoléculas (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos), pesticidas, factores que promueven el crecimiento de las plantas, biosensores, técnicas de diagnóstico y degradación de plaguicidas (Ghormade et al., 2011).

Los nanopesticidas sintetizan una amplia variedad de productos, algunos de los cuales ya están en el mercado, no pueden considerarse como una sola entidad, más bien las nanoformulaciones combinan varios tensioactivos, polímeros (orgánico) y nanopartículas metálicas (inorgánicas) en el rango de tamaño nanométrico (De Souza et al., 2013). Las Nanopartículas ofrecen una forma de controlar el suministro de pesticidas y lograr mayores efectos con dosis químicas más bajas (Fraceto et al., 2016), y son explotadas para mejorar problemas de baja solubilidad en agua, disminuyen la volatilización y mejoran la estabilidad al tiempo que proporcionan una liberación lenta sostenida (Sekhon, 2014). Los nanomateriales utilizados para formular nanoplaguicidas tienen propiedades deseadas, tales como biodegradabilidad, solubilidad, permeabilidad y estabilidad térmica (Bouwmeester et al., 2009).

Las NPs pueden ser utilizadas en los fungicidas en la agricultura moderna de la Nueva Revolución Verde, pero aplicándolos en muy bajas dosis (Lira et al., 2018). Estos pueden ser más fácilmente tomados por las plantas, y pueden ser programados para ser liberados en un tiempo o en condiciones determinadas, así mismo, se emplean para prolongar la conservación de frutas, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos (Ávalos et al., 2013).



Las nanopartículas metálicas son una opción para el control de hongos y bacterias fitopatógenas, además presentan baja toxicidad para las células que no están en constante división y poseen amplio espectro de acción (Ávila et al., 2020).

Mehrazar et al. (2015) uno de los problemas típicos en el manejo de los cultivos en la agricultura es la presencia de malezas, fuente para la propagación de plagas y enfermedades, y para combatir este tipo de problemas se ha optado por emplear nanoherbicidas. Algunas NPs tienen como objetivo específico destruir malezas, para evitar competencia con las plantas cultivadas y conseguir mayores rendimientos (Prasad et al., 2014).

Pariona et al. (2018), evaluaron diferentes concentraciones de NPs-Cu contra cinco especies de hongos fitopatógenos (*Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Verticillium dahlie*, *Neofusicoccum sp.* y *Fusarium oxysporum*). Los resultados demostraron que las diferentes concentraciones de NPs-Cu ejercen un efecto antifúngico sobre todas las cepas de hongos fitopatógenos.

Por su parte Krishnaraj et al. (2012), probaron diferentes concentraciones de NPs de Plata para conocer los efectos en *A. alternata*, *S. sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *R. solani*, *B. cinerea* y *Curvularia lunata*, mostrando una excelente actividad antifúngica.

En definitiva, se espera que las nanoformulaciones aumenten la aparente solubilidad de ingredientes activos poco solubles, para liberar el ingrediente activo de manera lenta/específica y para proteger contra la degradación prematura (Sekhon, 2014).

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del área de estudio

El presente estudio se desarrolló dentro del laboratorio del Centro de Estudios Ambientales del campus Balzay, en el laboratorio de Ingeniería y en el laboratorio de propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, correspondientes a la Universidad de Cuenca, situados a 2600 m s.n.m.

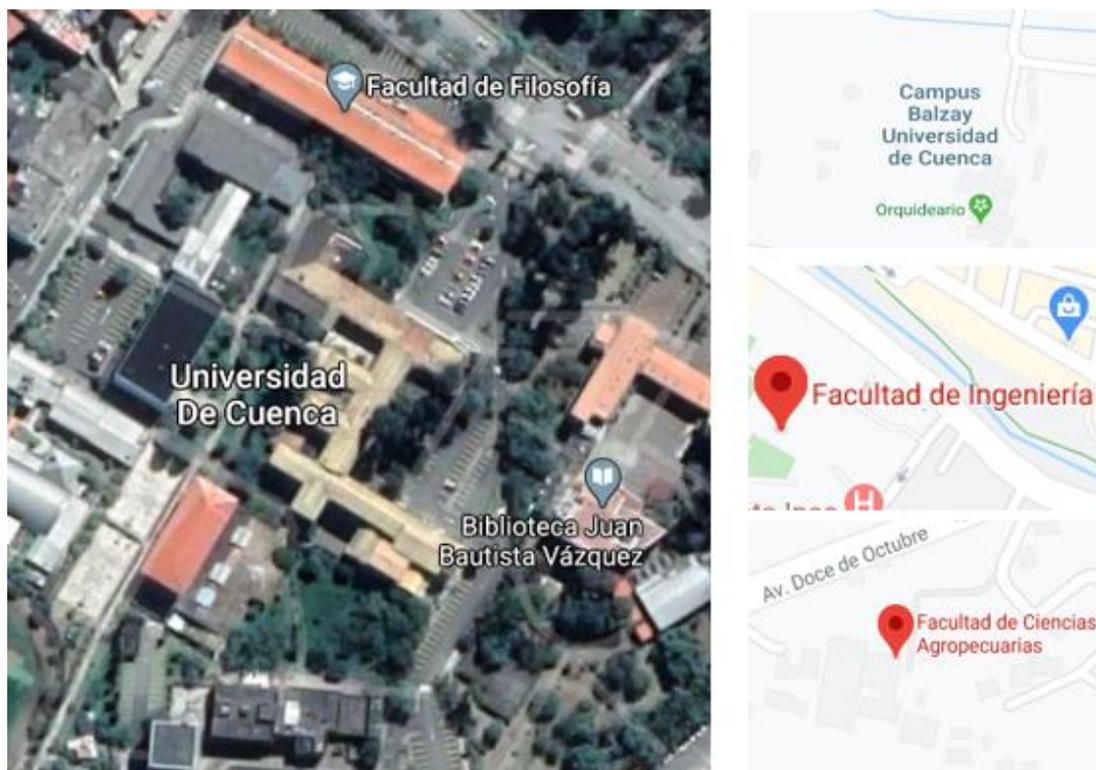


Figura 1. Mapa de ubicación del presente estudio en la provincia de Azuay.

Fuente: Google earth, 2020

3.2 Metodología de investigación

3.2.1 Obtención de la solución de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel

El procedimiento consistió en adicionar el Diclorometano en un frasco en conjunto con el ácido poliláctico los mismos que fueron llevados a la estufa por 35 min a una temperatura de 40⁰C a 20 rpm. Después de transcurrido ese tiempo se colocó el dimetilsulfóxido. En el proceso se utilizó un agitador magnético para la completa disolución del polímero. Posterior a este proceso, se colocó 2mg de

las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en la solución (20ml), la misma fue llevada al sonicador en tres ciclos de 15 min para que se dispersen por completo las partículas en la solución. La concentración final de la solución obtenida fue de 2mg/20ml lo que equivale a 100mg/L de NPs.

3.2.2 Elaboración de la nanofibras

Las nanofibras se realizaron a partir de la solución de las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel obtenidas en el procedimiento anterior, se utilizó el equipo electrospinning (electrohilado) aplicando un voltaje de 18kV. Una bomba de jeringa (syringepump) alimentó con la solución en la punta de la aguja a una velocidad de 2 ml/h. Las nanofibras se recogieron en un tambor colector conectado a tierra situado a 5 cm de la aguja a temperatura ambiente. La velocidad del disco giratorio se ajustó a 1000 rpm (Figura 2).

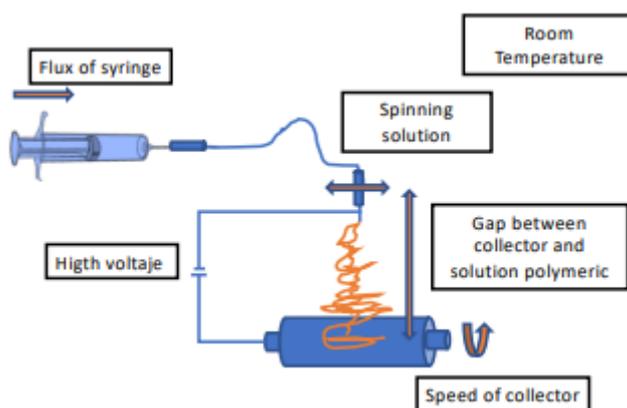


Figura 2. Esquema del Electrospinning.

Fuente: Cruzat et al., (2018)

3.3 Establecimiento de bioensayos

3.3.1 Reactivación de cepas de *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*

Se utilizaron cepas de los hongos de *Fusarium* y *Penicillium*, previamente aisladas e identificadas, mantenidas en el laboratorio de propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, mediante la técnica de resiembras sucesivas en medio de cultivo PDA (Papa Agar Dextrosa) en cajas Petri.



3.3.2 Bioensayos con solución de Nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel

Se realizó el ensayo utilizando el método de difusión en pocillos de agar usado por Sandhya & Kalaiselvam (2020), para esto se preparó un medio de cultivo PDA estéril, en el cual se agregó las diferentes concentraciones de la solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel en los pocillos de 5 mm de diámetro de la caja Petri detallados en la tabla 1. El inóculo de *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*, fue colocado en el punto céntrico de la caja Petri. Todas las actividades se realizaron en condiciones estériles y con procesos de desinfección. Se realizó cinco repeticiones por tratamiento tabla 2. Para el tratamiento control fue considerado un volumen de agua destilada estéril (25, 50, 75 y 100 μ l).

Tabla 1. Tratamientos con solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel con los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.* en condiciones *in vitro*.

Tratamientos	<i>Fusarium sp.</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	Agua destilada	25, 50, 75 y 100 μ l	Agua destilada	25, 50, 75 y 100 μ l
T1 Control	Agua destilada	25, 50, 75 y 100 μ l	Agua destilada	25, 50, 75 y 100 μ l
T2	Solución de NPs	0.0025mg/25 μ l	Solución de NPs	0.0025mg/25 μ l
T3	Solución de NPs	0.0050mg/50 μ l	Solución de NPs	0.0050mg/50 μ l
T4	Solución de NPs	0.0075mg/75 μ l	Solución de NPs	0.0075mg/75 μ l
T5	Solución de NPs	0.01mg/100 μ l	Solución de NPs	0.01mg/100 μ l

Tabla 2. Esquema de distribución al azar de los tratamientos y repeticiones de los bioensayos con solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel y los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*

1	2	3	4	5
T3	T4	T5	T2	T1
6	7	8	9	10
T1	T3	T2	T5	T4
11	12	13	14	15
T2	T1	T4	T3	T5
16	17	18	19	20
T4	T2	T3	T1	T5
21	22	23	24	25
T2	T5	T1	T4	T3

T1: Control (Agua destilada) T2: 0.0025mg T3: 0.0050mg T4: 0.0075mg T5: 0.01mg



3.3.3 Bioensayos con nanofibras de Óxido de Hierro y Níquel

Para los ensayos de inhibición *in vitro* con nanofibras, se preparó el medio de cultivo PDA y se esterilizó a 120°C por 20 min, se dispensó el medio de cultivo en cajas Petri y una vez gelificado el medio, sobre éste, en cada caja, se colocó los segmentos de 5mm² de nanofibras (2, 4, 6 y 8 capas) detallado en la tabla 3. Adicionalmente, en cada caja en el punto céntrico se sembró un segmento de 5mm de diámetro de cada hongo fitopatógeno *Fusarium sp.* o *Penicillium sp.* por separado. Cada tratamiento consta de 3 repeticiones (tabla 4). En el tratamiento control se colocó 2, 4, 6 y 8 capas de 5mm² de papel toalla, esterilizadas con el mismo protocolo.

Tabla 3. Tratamientos con nanofibras de NPs de Óxido de Hierro y Níquel con los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.* en condiciones *in vitro*.

Tratamientos	<i>Fusarium sp.</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
T1 Control	Segmento papel toalla	2,4,6,8 capas	Segmento papel toalla	2,4,6,8 capas
T2	Nanofibras	2 capas	Nanofibras	2 capas
T3	Nanofibras	4 capas	Nanofibras	4 capas
T4	Nanofibras	6 capas	Nanofibras	6 capas
T5	Nanofibras	8 capas	Nanofibras	8 capas

Tabla 4. Esquema de distribución al azar de los tratamientos y repeticiones de los bioensayos con capas de nanofibras de NPs de Óxido de Hierro y Níquel y los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*

1	2	3	4	5
T3	T4	T5	T2	T1
6	7	8	9	10
T1	T3	T2	T5	T4
11	12	13	14	15
T2	T1	T4	T3	T5

T1: Control (Papel toalla) T2: 2 Capas T3: 4 Capas T4: 6 Capas T5: 8 Capas



3.4 Especificación de las variables a evaluarse

3.4.1 Evaluación del porcentaje de inhibición

Después de la inoculación de los hongos en el medio de cultivo tratado con diferentes concentraciones de NPs y diferentes concentraciones de nanofibras, se registró el crecimiento del diámetro del micelio fúngico a los 7, 14 y 21 días.

La inhibición del diámetro se calculó con el control utilizado en la investigación. La siguiente fórmula utilizada por Pariona et al. (2018), nos sirvió para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar (%).

$$\text{PICM (\%)} = \left(\frac{D_c - D_t}{D_c} \right) * 100$$

PICM (%): es el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar.

D_c (cm): es el crecimiento del diámetro del hongo en el tratamiento control.

D_t (cm): es el crecimiento del diámetro del hongo en los tratamientos con NPs.

3.4.2 Toma de datos

Se registró los datos a los 7, 14 y 21 días, a partir de la fecha de siembra de las réplicas establecidas. Se llevó un registro de las medidas del radio de crecimiento de cada hongo en (cm) en relación con el crecimiento de los grupos de control. Se obtuvieron datos de crecimiento de los tratamientos de nanofibras y solución de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel.

3.4.3 Los métodos para el procesamiento de datos

Posterior a la toma de datos fue calculado el porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar PICM mediante la fórmula descrita anteriormente de las cepas inoculadas en este caso *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. Consecutivamente, se realizó una exploración de los datos con el objetivo de conocer si cumplen con los supuestos del Anova (normalidad, homogeneidad de varianzas). Para que puedan obedecer los supuestos anteriormente mencionados los datos de PICM fueron previamente transformados utilizando la siguiente transformación $y\sqrt{(X + 05)}$ (Banzatto y Kronka 2007).



Después de la transformación, fueron nuevamente verificados los supuestos de normalidad K (Shapiro-Wilks $\alpha=0.05$) y homogeneidad de variancias (Levene Test $\alpha=0.05$), para verificar si la transformación fue eficiente en adecuar la variable respuesta al supuesto infringido (Tablas 5 y 6). Los datos presentados en las tablas de resultados son los originales es decir sin transformación.

3.5 Diseño experimental

En la evaluación de la eficiencia de concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento *in vitro* tanto de *Penicillium* como de *Fusarium* fue utilizado un Diseño Completo al Azar (DCA), en esquema de parcelas subdivididas en el tiempo con cinco repeticiones. Las parcelas fueron las cinco concentraciones de NPs (control, 0.0025mg, 0.0050mg, 0.0075mg, 0.01mg). En las subparcelas fueron evaluados los tres diferentes periodos de tiempo (7, 14, y 21 días). Si la variable evaluada cumplió con los supuestos se realizó ANOVA y al existir efectos significativos entre los tratamientos se realizó una comparación de medias utilizando el test de Tukey, las medias de cada tratamiento fueron comparadas al nivel de significancia de ($P < 0.05$).

De la misma forma, para evaluar la eficiencia del número de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento *in vitro* de *Penicillium* y *Fusarium*, se utilizó un diseño completamente al azar, en un esquema de parcelas subdivididas en el tiempo, con tres repeticiones. Se probaron diferentes números de capas en las parcelas (control, 2, 4, 6 y 8 capas). En las subparcelas se evaluaron tres períodos diferentes (7, 14 y 21 días). Los valores medios fueron comparados mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos después de la aplicación *in vitro* de diferentes concentraciones de solución y número de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel para el control de *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.* durante los tres diferentes tiempos (7, 14, 21 días).

Se detalla en las tablas 5 y 6 los resultados del test de Shapiro-Wilks y de Levene para la variable analizada, posterior a la aplicación de diferentes concentraciones y número de capas de nanofibras en el control de *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.* se observa que todos los datos cumplen con los supuestos preestablecidos para la realización de un análisis de varianza.

Tabla 5. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para la variable PICM de los hongos *Fusarium sp* y *Penicillium sp.* en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.

Variable	Contraste de normalidad test de Shapiro -Wilks		Homogeneidad de varianzas test de Levene
	w	P	p
PICM FUSARIUM	0.97	0.07	0.08
PICM PENICILLIUM	0.97	0.09	0.55

Tabla 6. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para la variable PICM de *Fusarium sp* y *Penicillium sp.* en respuesta a los diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.

Variable	Contraste de normalidad test de Shapiro -Wilks		Homogeneidad de varianzas test de Levene
	w	p	p
PICM FUSARIUM	0.96	0.11	0.56
PICM PENICILLIUM	0.97	0.5	0.7



4.1.1 Efecto de soluciones de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de *Fusarium* sp.

Se calculó el PICM de la cepa de hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. para evaluar la actividad biocida de las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel con diferentes concentraciones de solución (0.0025mg, 0.0050mg, 0.0075mg, 0.01mg), los datos fueron registrados a los 7, 14 y 21 días.

En el análisis de varianza (ANOVA) detallado en la Tabla 7 se observa una interacción significativa entre los factores concentración de NPs y días evaluados.

Tabla 7. Análisis de Varianza para el Diseño Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo considerando la variable PICM de *Fusarium* sp. con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	P-valor
Concentración	4	16958.57	4239.64	2121.64	2.2e-16***
Día	2	3276.76	1638.38	435.01	2 e-16***
Concentración*día	8	1567.70	195.96	52.03	1.2e-16***
Error 1	16	31.977	1.99		
Error 2	44	165.718	3.77		
Total	74	23566.7			
CV 1 %=	7.11		CV2 %=	9.76	

GL = grados de libertad, CV= coeficiente de variación, ***= significativo al 0.001%

Debido a la evidente significancia del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial analizada en la cepa *Fusarium*, fue realizada la prueba de Tukey, a un nivel de significancia $p < 0.05\%$, detallado en la Tabla 8.



Tabla 8. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial (PICM) de *Fusarium sp.* en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel evaluados en tres diferentes tiempos.

Hongo	Concentraciones (mg)	PICM %		
		7 días	14 días	21 días
<i>Fusarium sp.</i>	0.00	1.00 e C	1.00 e C	1.00 d C
	0.0025	14.70 d A	6.03 d B	2.96 d B
	0.0050	24.23 c A	12.32 c B	12.07 c B
	0.0075	48.72 b A	32.19 b B	18.93 b C
	0.01	55.56 a A	37.49 a B	29.44 a C

Medias seguidas por letras iguales, minúsculas en la columna y mayúsculas en la línea, no son diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En la variable analizada PICM los factores concentración y días evaluados presentaron interacción significativa (Tabla 8). A los 7 días de crecimiento del hongo las diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel presentaron inhibición del crecimiento en todos los tratamientos excepto el tratamiento control, siendo evidente que el tratamiento 0.01mg de NPs alcanzó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial 55.56% presentando diferencia estadística, en comparación con los otros tratamientos el PICM fue 48.72% en la concentración de 0.0075mg seguidos por los tratamientos de 0.0025mg y 0.0050mg con porcentajes de 24.23% y 14.70% evidenciando diferencias entre cada tratamiento.

A los 14 días el porcentaje de inhibición se redujo en todos los tratamientos, las concentraciones de 0.0025mg y 0.0050mg de NPs presentaron menor porcentaje de inhibición, 6.03% y 12.31% respectivamente, observándose diferencia estadística al comparar con los tratamientos de 0.0075mg y 0.01mg que evidenciaron porcentajes más altos de inhibición de 32.19% y de 37.49%.

El mayor porcentaje de inhibición a los 21 días fue observado en la concentración 0.01mg con 29.44%, y difiere estadísticamente del tratamiento 0.0075mg con 18.93% seguido por los tratamientos 0.0025mg y 0.0050mg que presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de 2.96% y 12.07%



4.1.2 Efecto de soluciones de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de *Penicillium* sp.

En la Tabla 9 se observa el Análisis de Varianza (ANOVA) de la variable PICM en la cepa *Penicillium* sp. y es posible verificar diferencia significativa entre la variable analizada y los días evaluados.

Tabla 9. Análisis de Varianza para el Diseño Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo, considerando la variable PICM de *Penicillium* sp. con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	p-normal
Concentración	4	25523.39	6380.85	6818.76	2e-16***
Día	2	6419.64	3209.82	3207.16	2e-16***
Concentración*día	8	3803.09	475.39	474.99	2e-16***
Error 1	16	11.58	0.72		
Error 2	44	44.04	1.00		
Total	74	35801.75			
CV 1 %=	3.62		CV2 %=	4.25	

GL = grados de libertad, CV= coeficiente de variación, ***= significativo al 0.001%, *= significativo al 0.05%

Al realizar el análisis de varianza para el PICM en *Penicillium* sp. se observó una evidente interacción entre los factores evaluados es por esto que posteriormente fue realizado el test de Tukey 0.05% detallado en la tabla 10.

Tabla 10. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Miceliar (PICM) de *Penicillium* sp. en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel evaluados en tres diferentes tiempos.

Hongo	Concentraciones		PICM%		
	(mg)		7 días	14 días	21 días
<i>Penicillium</i> sp.	0.00		1.00 e B	1.00 e B	1.00 e B
	0.0025		13.37 d A	2.87 d B	2.76 d B
	0.0050		47.74 c A	18.18 c B	6.05 c C
	0.0075		52.97 b A	38.47 b B	12.64 b C
	0.01		61.36 a A	52.49 a B	40.47 a C

Medias seguidas por letras iguales, minúsculas en la columna y mayúsculas en la línea, no son diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).



Un comportamiento similar al PICM en la cepa *Fusarium* sp. es observado también en la cepa *Penicillium* sp (tabla 10). Al comparar con los otros días evaluados, la primera fecha de evaluación evidenció en los tratamientos (0.0025mg, 0.0050mg, 0.0075mg y 0.01mg), el mayor PICM con diferencia estadística en cada tratamiento. A los 7 días, las concentraciones 0.01mg y 0.0075mg presentan porcentajes de 61.36% y 52.97%, y en los tratamientos de 0.0050mg y 0.0025mg presentaron un PICM del 47.74% y 13.37% respectivamente.

De manera general la variable analizada disminuyó a los 14 días, sin embargo, el mayor PICM 52.49% conservó la concentración 0.01mg siendo estadísticamente significativa en los tratamientos 0.0075mg que presentó un porcentaje de 38.47% y 0.050mg con un porcentaje de 18.18%, la menor concentración de 0.0025mg al igual que el tratamiento control presentaron los menores porcentajes de inhibición de 2.87% y 1%.

Finalmente, podemos observar que, a los 21 días, los porcentajes de inhibición disminuyeron, con un 1% de inhibición observados en el tratamiento control y 2.76% del tratamiento de 0.0025mg en el tratamiento con 0.0050mg el porcentaje de inhibición fue 6.05% en la concentración 0.0075mg el porcentaje de inhibición fue 12.64% y el tratamiento 0.01mg presentó el mayor porcentaje de inhibición 40.47%, evidenciándose diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos evaluados.

4.1.3 Efecto de nanofibras de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de *Fusarium* sp.

De acuerdo al análisis de varianza, el PICM en *Fusarium*, se evidenció efecto estadísticamente diferente en cada factor evaluado y en la interacción número de capas - tiempo (Tabla 11), lo que indica que el porcentaje de inhibición fue independiente de los diferentes tiempos analizados.



Tabla 11. Análisis de Varianza para el Delineamiento Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo, considerando la variable PICM de *Fusarium sp.* sometida a diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	p-normal
Concentración	4	11785.52	2946.41	533.04	2.2e -16***
Día	2	1147.75	573.87	154.91	8.5e-16***
Concentración*día	8	469.95	154.91	15.86	3.09e-08***
Error 1	8	44.22	5.53		
Error 2	22	81.50	15.857		
Total	44	13529.07			
CV 1 %=	11.81		CV2 %=	9.67	

GL = grados de libertad, CV= coeficiente de variación, ***= significativo al 0.001%

Al realizar la prueba de Tukey fue confirmada la diferencia estadística en los diferentes tratamientos analizados, observándose que el número de capas 6 y 8 fueron más eficientes presentando valores superiores de PICM para la cepa de *Fusarium* Tabla 12.

Tabla 12. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial (PICM) de *Fusarium sp.* en respuesta a los diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.

Hongo	Número de capas			PICM %		
		7 días	14 días	21 días		
	0	1.00 e B	1.00 d B	1.00 c B		
	2	14.34 d A	9.48 c B	3.00 c B		
<i>Fusarium sp.</i>	4	22.38 c A	10.70 c B	3.00 c B		
	6	44.86 b A	32.05 b B	23.57 b B		
	8	50.10 a A	41.30 a A	40.87 a A		

Medias seguidas por letras iguales, minúsculas en la columna y mayúsculas en la línea, no son diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Al observar el efecto de los tratamientos con 2, 4, 6 y 8 capas de nanofibras de NPs de Óxido de Hierro y Níquel en el PICM *in vitro* de *Fusarium sp.* a los 7 días en presencia de las nanofibras, notamos inhibición del crecimiento en todos los tratamientos con excepción del tratamiento control, demostrándose que existe



diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05\%$) con respecto a todos los tratamientos. La variable analizada con 6 y 8 capas de nanofibras alcanzaron porcentajes superiores de 44.86% y 50.10%, mientras que los tratamientos con 2 y 4 capas presentaron porcentajes de inhibición de 14.34% y 22.38% respectivamente.

A los 14 días, el tratamiento con 8 capas presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento 41.3% y se observa diferencia estadística con el tratamiento de 6 capas con 32.05% de inhibición, de la misma forma estos son estadísticamente significativos al comparar con los tratamientos de 4 y 2 capas que registran un PICM de 10.70% y 9.48% respectivamente.

Similar comportamiento es observado a los 21 días donde el tratamiento de 8 capas alcanzó un porcentaje de inhibición del 40.87%, y el tratamiento de 6 capas un 23.57%, demostrando diferencia estadística al comparar con los tratamientos de 2 y 4 capas que muestran un porcentaje de inhibición de 3%, y 1% para el tratamiento control. Cabe mencionar que el tratamiento con número de 8 capas presenta los mayores PICM en todos los días evaluados.

4.1.4 Efecto de nanofibras de nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel en el crecimiento de *Penicillium sp.*

La Tabla 13 presenta el Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable PICM de la cepa *Penicillium sp.* demostrando diferencias significativas al 0.05%.

Tabla 13. Análisis de Varianza para el Diseño Completamente al Azar (DCA) en esquema de parcela subdividida en el tiempo, considerando la variable PICM de *Penicillium sp.* sometida a diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel.

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	p-normal
Concentración	4	25065.18	6266.29	1699.16	2.2e-16
Día	2	455.46	227.73	106.42	1e-16
Concentración*día	8	260.95	32.62	15.24	3.53e-11
Error 1	8	29.50	3.68		
Error 2	22	47.08	2.14		
Total corregido	44	25858.2			
CV 1 %=	7.94		CV 2 %=	6.05	

GL = grados de libertad, CV= coeficiente de variación, ***= significativo al 0.001%, **= significativo al 0.01%



Se observa en la Tabla 14 un mayor PICM con el tratamiento de 8 capas de nanofibras en la cepa *Penicillium* sp. El número de capas 2 y 4 provocaron a un menor PICM en este fitopatógeno analizado de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05%).

Tabla 14. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Miceliar (PICM) de *Penicillium* sp. en respuesta a los diferentes números de capas de NPs de Óxido de Hierro y Níquel, evaluados en tres diferentes tiempos.

Hongo	Número de capas	PICM %		
		7 días	14 días	21 días
<i>Penicillium</i> sp.	0	1.00 e B	1.00 d B	1.00 c B
	2	11.83 d A	3.00 d B	3.00 c B
	4	18.50 c A	5.51 c B	3.00 c B
	6	49.20 b A	45.01 b A	41.44 b B
	8	62.32 a A	57.36 a A	57.35 a A

Medias seguidas por letras iguales, minúsculas en la columna y mayúsculas en la línea, no son diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

De manera general en *Penicillium* sp. el tratamiento con 8 capas de nanofibras presentó mayor PICM en todos los días evaluados. A los 7 días el PICM fue de 62.32%, seguido por el tratamiento de 6 capas con un PICM de 49.20% observando una diferencia estadísticamente significativa al comparar con los tratamientos de 2 y 4 capas, que evidenciaron un PICM de 11.83% y 18.50%, mientras el tratamiento control posee los menores PICM 1% en todos los tiempos evaluados.

A los 14 días, podemos observar que el tratamiento con 8 capas presentó el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento con un 57.36% y varía estadísticamente con el tratamiento de 6 capas que presentó un PICM de 45.01%, y de 4 capas con un PICM de 5.51% que tiene significancia estadística cuando comparamos con el tratamiento de 2 capas con un PICM de 3%.

Similar comportamiento es evidenciado a los 21 días, el tratamiento de 8 capas presentó un porcentaje de inhibición del 57.35%, y el tratamiento de 6 capas

posee un PICM de 41.44%, nuevamente los tratamientos de 4 y 2 presentaron un PICM de 3.00%.

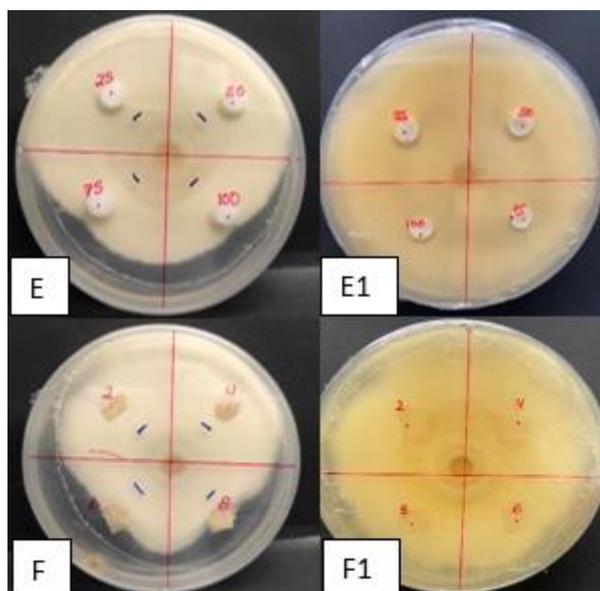


Figura 3. Inhibición del crecimiento micelial a los 21 días con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Niquel en *Fusarium* sp. (E) Tratamiento con concentraciones de solución de NPs. (E1) Tratamiento control. (F) Tratamiento con capas de nanofibras. (F1) Tratamiento control.

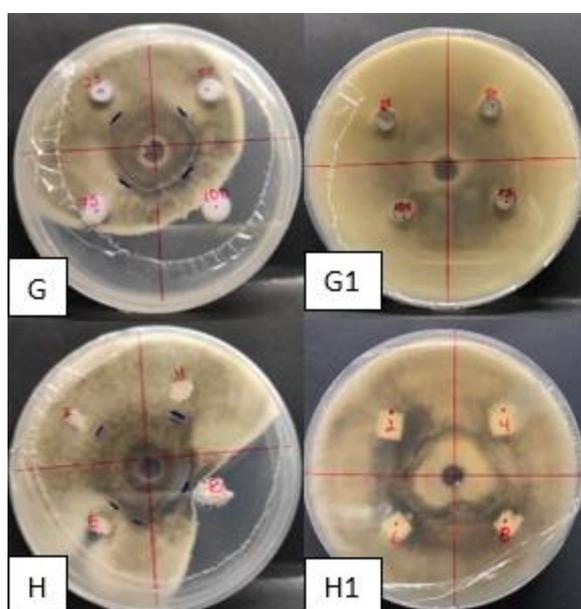


Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial a los 21 días con diferentes concentraciones de solución de NPs de Óxido de Hierro y Niquel en *Penicillium* sp. (G) Tratamiento con concentraciones de solución de NPs. (G1) Tratamiento control. (H) Tratamiento con de nanofibras. (H1) Tratamiento control.



CAPITULO V: DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación confirman el efecto inhibitorio de las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel sobre el crecimiento micelial de *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*, independiente de la forma de aplicación los tratamientos con mayor concentración o mayor número de capas fue proporcional a un mayor porcentaje de inhibición micelial.

El incremento en las concentraciones de NPs de Óxido de Hierro y Níquel se correlacionó con el efecto antifúngico de las mismas, además, las NPs mostraron un efecto diferencial entre las cepas, siendo más efectivo en inhibir el crecimiento de *Penicillium sp.*, logrando inhibir el crecimiento micelial hasta en un 40.47% a los 21 días con la concentración más alta (0,01mg). En el caso de *Fusarium sp.* la inhibición del crecimiento fue menos efectiva, ya que inhibió su crecimiento en un 29.44% a los 21 días con la concentración más alta utilizada en los ensayos con solución, mientras que en los ensayos con diferentes números de capas de nanofibras, la inhibición fue del 57.35% en el crecimiento de *Penicillium sp.* y de 40.87% en *Fusarium sp.* con el mayor número de capas usadas (8 capas) a los 21 días.

El efecto antifúngico de las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel evaluadas en nuestro estudio, coinciden con los resultados reportados por Koka et al. (2019), quienes evaluaron la actividad antifúngica de nanopartículas de Óxido de Hierro, revelando que causaron considerable inhibición en el crecimiento del micelio de los patógenos *Penicillium expansum* (12.33 mm) y *Penicillium chrysogenum* (12.66 mm), resultando más eficaz la concentración de 0.5 mg/ml. Cruzat et al. (2018), demostraron efectos antifúngicos al aplicar de NPs de Óxido de Hierro y Níquel para el control de *Fusarium sp.*

Sunitha et. (2013), reportan que el mecanismo de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas se debe a su pequeño tamaño y su gran superficie de contacto en relación al volumen, que cubre eficazmente el microorganismo y reduce el suministro de oxígeno para la respiración.

La actividad inhibitoria de las NPs también se debe a la inducción del estrés oxidativo, la liberación de iones metálicos y los mecanismos no oxidativos (Wang, Hu, & Shao, 2017). Moghaddam et al. (2015) observaron que uno de los



posibles motivos para no inhibir en un mayor porcentaje del crecimiento micelial de un hongo se debe a que los hongos son muy tolerantes y presentan una gran capacidad de bioacumulación de metales.

Sharmin et al. (2021) informaron que la actividad antimicrobiana de las NPs Óxido de Hierro se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño a las proteínas y al ADN de las células fúngicas de los microorganismos por estrés oxidativo. El estrés oxidativo en las células fúngicas por la formación de especies reactivas de oxígeno puede destruir la célula y exhibir actividad antifúngica (Parveen et al., 2018), lo que posteriormente resulta en la inhibición del crecimiento celular y eventualmente la muerte celular (Xie et al., 2011).

Por su parte Sharma et al. (2017), en su estudio reveló que las diferentes concentraciones de nanopartículas de ferrita de Níquel (NiFe_2O_4) tenían efectos inhibidores contra el crecimiento de micelios de *Fusarium oxysporum*. La inhibición más alta del crecimiento micelial (89,45%) se encontró a 500 ppm. Resultados similares informó Ahmed et al. (2016), en los que las nanopartículas de Níquel a la concentración de 100 ppm causaron una inhibición del 60,23% y del 59,77% en el crecimiento de micelios de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, respectivamente. En un estudio similar realizado por Golkhatmi et al. (2017), afirman que las nanopartículas de Óxido de Hierro y Níquel poseen una excelente propiedad antifúngica en el desarrollo de *Fusarium oxysporum*.

Según Ahmada et al. (2013), las nanopartículas con su gran relación superficie/volumen, exhiben propiedades antimicrobianas activas debido a su mayor capacidad para interactuar con las membranas celulares mediante la alteración de la estructura de la pared celular, afectando la cadena respiratoria y la división celular en el ADN.

Parveen et al. (2018) indicaron que todas las concentraciones evaluadas mostraron una zona significativa de inhibición contra todos los patógenos fúngicos seleccionados. La zona más alta de inhibición fue mostrada por la mayor concentración de nanopartículas de Óxido de Hierro (0.5 mg/ml). La zona máxima de inhibición se mostró contra *Penicillium chrysogenum* (28,67 mm).



Las nanopartículas de Óxido de Hierro muestran una actividad antifúngica mejorada debido a su diminuto tamaño y estabilidad (Machado et.,. 2015). Según Nejad et. (2016), es probable que el tamaño de las NPs también juegue un papel clave en su permeabilidad y actividad antifúngica.

En nuestro trabajo los porcentajes de inhibición, incluso con concentraciones menores fueron más altos a los reportados por Koka et al. (2019), y también pudimos evidenciar que el efecto disminuye con el paso del tiempo, siendo más eficiente usar la concentración más alta 0.01mg) ya que su efecto es mayor y más durable, en cuento a las nanofibras de igual forma el mayor número de capas usadas presenta un efecto inhibidor del crecimiento más eficiente y durable en ambas cepas.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Se pudo determinar que las NPs de Óxido de Hierro y Níquel presentan un efecto inhibitor del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp.

Las NPs Óxido de Hierro y Níquel en forma de solución y como capas de nanofibras mostraron más efectividad en inhibir el crecimiento micelial de *Penicillium* sp., que el de *Fusarium* sp.

Las nanofibras fueron más efectivas en inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. en comparación con las soluciones.

El efecto inhibitor del crecimiento de las NPs, tanto en soluciones como en nanofibras disminuye con el paso del tiempo, pero se mantiene hasta los 21 días, en la concentración más alta de las soluciones evaluadas (0,01mg) y con el mayor número de capas usadas (8).

De acuerdo a los resultados, se puede concluir que las NPs de Óxido de Hierro y Níquel aplicadas en forma de solución y nanofibras tienen una actividad antifúngica activa, por lo que tienen el potencial para ser considerados como un fungicida ecológico.



6.2 Recomendaciones

Se recomienda continuar con la investigación para evaluar la actividad biocida de las NPs de Óxido de Hierro y Níquel de forma directa en los cultivos, tanto en condiciones de campo abierto como de invernadero, para tratar estas enfermedades *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp.

Es necesario evaluar la efectividad de las nanofibras en condiciones de poscosecha, como inhibidor del crecimiento micelial de *Penicillium* sp.

Es importante evaluar la actividad biocida de las NPs de Óxido de Hierro y Níquel sobre otros microorganismos fitopatógenos.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, I. (2013). Ventajas salariales en cultivos de exportación. Dos realidades en México y Chile. . *Economía Latinoamericana*, 24, 48-51.
- Aguirre, I., Pinto, U., Rodriguez, B., Monribot, L., & Vega, J. (2019). Fusarium dieback in avocado modifies metabolite profile, global gene expression and impacts active rhizospheric microbiome. *Mexican Journal of Phytopathology*, 15-22.
- Agrios. (2011). *Fitopatología*. México : Limusa.
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. Burlington: Academic Press.
- Agrobiotecnología. (2013). Obtenido de <https://es.slideshare.net/santi120/clase-11-resistencia-a-hongos-fitopatogenos-2013>
- Agrosintesis. (2016). *Aplicación de la nanotecnología para formulación de plaguicidas, fertilizantes y otros agroquímicos*. Obtenido de AgroSíntesis: <https://www.agrosintesis.com/aplicacion-la-nanotecnologia-formulacion-plaguicidas-fertilizantes-otros-agroquimicos/>
- Ahmada, T., Wani, I., Manzoor, N., Ahmedc, J., & Asir, A. (2013). Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 227–234.
- Ahmed, I., Yadav, D., & Lee, Y. (2016). Applications of Nickel Nanoparticles for Control of Fusarium Wilt on Lettuce and Tomato. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 5, 1-8.
- Almándo, J., Muiño, B., & Martín, E. (2010). Efecto in vitro del fungicida iprodione sobre alternaria spp. y prospección para su inclusión en estrategias de manejo en papa, tomate, ajo y cebolla. *Fitosanidad* , 171-176.
- Ávalos, A., Haza, A., Mateo, D., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1-23.



- Ávila, G., Muñoz, L., & Espino, G. (2020). Uso de nanopartículas para el control de hongos y bacterias. *2000 AGRO*, 53-65.
- Banzatto, D. A., Kronka, S. (2006). Experimentação agrícola 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2006 237p:il. ; 29cm|ISBN: 85-87632-71-X
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M., Hagens, W., Bulder, A., De Heer, C., . . . Sips, A. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 53 , 52-62.
- Carrillo, L. (2006). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Obtenido de <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/5penicilios.pdf>
- Chen, H., & Yada, R. (2011). Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. *Trends in Food Science and Technology*, 585-594.
- Choudhary, R., Kumaraswamy, R., Kumari, S., Sharma, S., Pal, A., Raliya, R., & Saharan, V. (2017). Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Scientific Reports*, 1-11.
- Corredor, J., & Echeverría, F. (2007). Nanoparticled iron oxides synthesis. *Scientia et Technica*, 1-6.
- Cruzat, C., Vanegas, E., Peña, D., Arrue, R., Novoa, N., Pauta, G., . . . Peña, O. (2018). *Biopolymer nanofiber doped with nanospinels by electrospinning and microbiological assays*. Obtenido de <https://doi.org/10.26799/cp-nanotechfrance2018>
- Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R. S., & Kumar, A. (2014). Nanotechnology in agro-food: from field to plate. *Food Research International*, 381-400.
- De Souza, P., Perlatti, B., Fernandes, M., Batista, J., & Forim, M. (2013). Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. *Development of Safer and More Effective Technologies*, 523–550.



- Dean, R., Van, J., Pretorius, Z., Hammond, K., Di Pietro, A., Spanu, P., . . . Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 414–430.
- Di Liberto, M., Stegmayer, M., Svetaz, L., & Derita, M. (2019). Evaluation of Argentinean medicinal plants and isolation of their bioactive compounds as an alternative for the control of postharvest fruits phytopathogenic fungi. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 686-688.
- Do Cuoto, G. (2006). Nanopartículas de Níquel: síntese, caracterização, propiedades e estudo de sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono. Obtenido de <http://www.quimica.ufpr.br/cpgquim/pgq/dissert/M04108.pdf>
- Duhan, J., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., & Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, 15, 11–23.
- Echegoyen, Y., & Nerín, C. (2013). Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology* 62, 16-22.
- Esparza, E. (2015). *Actividad Antimicrobial de Nanopartículas de Cobre y Óxido de Zinc contra Hongos y Bacterias Fitopatógenas*. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6670/T20455%20ESPARZA%20RIVERA%2c%20ELDA%20LUZ%20%2063346.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fraceto, L., Grillo, R., & Abhilash, P. (2016). Nanotecnología aplicada a la bioencapsulación de pesticidas. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1231-1234.
- Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*.
- Ghormade, V., Deshpande, MV., Paknikar, KM. (2011) Perspectivas para nanobiotecnología habilitadas protección y nutrición de plantas. *Biotechnol Adv* 29, 792–803.



- Golkhatmi, F., Bahramian, B., Mamarabadi, & Mojtaba. (2017). Application of surface modified nano ferrite nickel in catalytic reaction (epoxidation of alkenes) and investigation on its antibacterial and antifungal activities. *Materials Science and Engineering*, 78, 1-11.
- Gómez, M., & Rodríguez, A. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrízica: una revisión. *Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV No. 1*, 271-284.
- Gonzales, M., Alcalde, A., Valverde, V., & Villanueva, D. (2020). Electrospinning: Advances and applications in the field of biomedicine. *Rev. Fac. Med. Hum.*, 20, 706-713.
- Hayles, J., Johnson, L., Worthley, C., & Losic, D. (2017). Nanopesticides: A review of current research and perspectives. *New Pesticides and Soil Sensors*, 193-225.
- Hobbelen, P., Paveley, N., Oliver, R., & Van Den Bosch, F. (2013). The usefulness of concurrent, alternating and mixture use of two high-risk fungicides for delaying the selection of resistance in populations of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Phytopathology* 103, 690–707.
- Hollomon, D., & Ishii, H. (2015). *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Japan: Springer. ISBN .
- Hulla, J., Sahu, C., & Hayes, A. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, 1318–1321.
- Jaramillo, G. (2019). El monitoreo de sensibilidad de los hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea* y *Mycosphaerella fijiensis*) a fungicidas, como herramienta para la toma de decisiones. *Archivos Académicos USFQ*, 24.
- Jarvie, H., Dobson, P., & King, S. (2019). *Nanoparticle*. Obtenido de <https://www.britannica.com/science/nanoparticle>
- Juárez, G., Sosa, M., & López, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 14-23.



- Kah, M. (2015). Nanopesticides and nanofertilizers: ¿emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? *Frontiers in Chemistry*, 1-6.
- Kilani, O., Ben, S., Dammak, M., Kamoun, A., Jabnoun, H., Daami, M., & Tounsi, D. (2016). Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological Control*, 95, 73-82.
- Koka, J., Wani, A., & Bhat, M. (2019). Evaluation of antifungal activity of Magnesium oxide (MgO) and Iron oxide (FeO) nanoparticles on rot causing fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 173-178.
- Kohsari, I., Shariatnia, Z., & Pourmortazavi, S. (2015). Antibacterial electrospun chitosan–polyethylene oxide nanocomposite mats containing bioactive silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 140.
- Krishnaraj, C., Ramachandran, R., Mohan, K., & Kalaichelvan, P. (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica Acta Part A*, 95-99.
- Lira, R., Méndez, B., De los Santos, G., & Vera, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Redalyc*, 32-62.
- Lombard, L., Sandoval, M., Lamprecht, S., & Crous, P. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43, 1–47
- López, H., Múzquiz, E., & Hernández, F. (2016). *Nanopartículas: aplicaciones actuales y futuras en la industria alimentaria*. Obtenido de <http://www.cienciacierta.uadec.mx/articulos/cc48/Nanoparticulas.pdf>
- Lucas, J., Fraaije, B., & Hawkins, N. (2015). The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 29-92.
- Macarisin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M., & Droby, M. (2007). *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Phytopathology*, 97, 1491-1500.



- Machado, S., Pacheco, J., Nouws, H., Albergaria, J., & Delerue, C. (2015). Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Science of the Total Environment*, 533, 76-81.
- Martínez, A., & Ramos, S. (2019). Agrobiodiversidad y fitopatógenos. *Mexican Journal of Phytopathology*, 12-14.
- Martinez, E. (2003). *Estudio de especies micotoxígenas del género Penicillium: Penicillium verrucosum Dierckx*. Obtenido de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5598/emb1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mesquida, C. D., Ramos, S. B., Zysler, R. D., Soldati, A. L., Soria, C., & Pettinari, G. R. (Julio de 2017). *Estudio de fluido magnetoreológico con nanopartículas de Níquel y base aceite*. Obtenido de <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/65389>
- Mehrazar, E., Rahaie, M., & Rahaie, S. (2015). Application of nanoparticles for pesticides, herbicides, fertilizers and animals feed management. *International Journal of Nanoparticles*, 8, 1-19.
- Moghaddam, A., Namvar, F., Moniri, M., Tahir, P., Azizi, S., & Mohamad, R. (2015). Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. *Molecules*, 20, 16541-16565.
- Mohammed, L., Gomaa, H., Ragab, D., & Zhu, J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 1-14.
- Mongkol, R., Piapukiew, J., & Chavasiri, W. (2016). Chemical constituents from *Melodorum fruticosum* Lour. flowers against plant pathogenic fungi. *Agriculture and Natural Resources*, 50, 270-275.
- Naderi, M., & Danesh, A. (2013). Nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5, 2229-2232.



- Nejad, M., Shahidi, G., Khatami, M., Amini, A., & Aghighi, S. (2016). In vitro and in vivo antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a common agent of rice sheath blight disease. *IET Nanobiotechnology*, 11, 236-240.
- Oliveira, H., Stolf-Moreira, R., Martinez, C., Grillo, R., De Jesus, M., & Fraceto, L. (2015). Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. *PLoS One*, 10, 132-145.
- Palencia, S., & Combatt, E. (2013). Toxicity of inorganic nanoparticles on soil microorganisms with agricultural importance. *ResearchGate*, 106-122.
- Pariona, N., Montero, H., Enriquez, A., Sánchez, R. C., Lopez, D., Rosas, G., . . . Duran, Z. (2018). Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. *ECIPerú*, 1-8.
- Park, H., Soung, H., Hwa, K., & Seong, C. (2006). A New Composition of Nanosized Silica-Silver for Control of Various Plant Diseases. *The Plant Pathology Journal* 22, 295-302.
- Parveen, S., Hamid, A., Ashraf, M., Sylvia, H., Yaqub, M., & Abdullah, J. (2018). Preparation, characterization and antifungal activity of iron oxide nanoparticles. *Microbial Pathogenesis*, 287–292.
- Peters, R., Bouwmeester, H., Gottardo, S., Amenta, V., Arena, M., & Brandhoff, P. (2016). Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends Food Sci Technol*, 54, 155-164.
- Pino, S., Aguilar, H., Azuero, E., & Sisalema, L. (2018). Contribution of the agricultural sector to the economy of Ecuador. Critical analysis of its evolution in the period of dollarization. Years 2000–2016. *Espacio Vol. 39*, 39-51.
- Ploetz, R. (2015). Fusarium wilt of banana. *Phytopathology*, 105, 1512-1521.
- Prasad, R., Kumar, V., & Kumar, S. (2014). Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology* , 705-713.



- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2008). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 7, 76-83.
- Ramírez, K., Salinas, A., & Trigos, Á. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Rev. Mex. Mic*, 125-129.
- Rivera, J. (2008). Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. *FHIA*, 1-4.
- Rodríguez, A. (2008). Caracterización de distintos Péptidos Antimicrobianos con actividad frente a hongos Fitopatógenos de interés Agroalimentario. *Madriz*, 12-23.
- Rubina, M., Vasil'kov, A., Naumkin, A., Shtykova, E., Abramchuk, S., Alghuthaymi, M., & Abd-Elsalam, K. (2017). Synthesis and characterization of chitosan–copper nanocomposites and their fungicidal activity against two sclerotiaforming plant pathogenic fungi . *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 7, 249–258.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M., Sharma, S., & Pal, A. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346–353.
- Sánchez, L., Rodríguez, L., & López, M. (2013). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Iberoamericana de Polímeros* 14.
- Sandhya, J., & Kalaiselvam, S. (2020). Biogenic synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles using inedible borassus flabellifer seed coat: characterization, antimicrobial, antioxidant activity and in vitro cytotoxicity analysis. *Mater. Res. Express* 7, 12-27.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Secur.*, 4, 519 - 537.
- Sekhon, B. (2014). Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 31-53.



- Sempere, F., & Santamarina, M. (2008). Los hongos como agentes de control biológico. *Phytohemeroteca*, 13-25.
- Sharma, I. (2021). *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology*. London: Academic Press.
- Sharma, P., Sharma, A., Sharma, M., Bhalla, N., Estrela, P., Jain, A., . . . Thakur, A. (2017). Nanomaterial Fungicides: In Vitro and In Vivo Antimycotic Activity of Cobalt and Nickel Nanoferrites on Phytopathogenic Fungi. *Global Challenges*, 1, 1-7.
- Sharmin, S., Rahaman, M., Sarkar, C., Atolani, O., Islam, M., & Adeyemi, O. (2021). Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Heliyon*, 7, 1-9.
- Shiva, V. (2016). *The violence of the green revolution : third world agriculture, ecology, and politics*. Kentucky: Lexington.
- Singh, A., Lal, M., Singh, S., Khan, A., Singh, S., & Tiwari, A. (2015). Scope of nanotechnology in future agriculture-an overview. *Agrica*, 1-13.
- Sotelo, M., Valverde, G., Plascencia, M., Correa, Z., & Jiménez, A. (2015). Characterization of Chitosan Nanoparticles added with Essencial Oils. . *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 589-599.
- Srilatha, B. (2011). Nanotechnology in Agriculture. *Journal of Nanomedic & Nanotechnology*, 2-7.
- Srinivas, C., Nirmala, D., Narasimha, K., Dhananjaya, C., Singh, B., & Chandra, S. (2019). Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1315–1324.
- Srivastava, S., Kadooka, C., & Uchida, J. (2018). Fusarium species as pathogen on orchids. *Microbiological Research*, 188-195.
- Subramanian, V., Semenzin, E., Hristozov, D., Zondervan, E., Linkov, I., & Marcomini, A. (2015). Review of decision analytic tools for sustainable nanotechnology. *Environment Systems and Decisions* 35, 29-41.



- Sunitha, A., Isaac, R., Sweetly, G., Sornalekshmi, S., Arsula, R., & Praseetha, P. (2013). Evaluation of Antimicrobial Activity of Biosynthesized Iron and Silver Nanoparticles Using the Fungi *Fusarium Oxysporum* and *Actinomyces* sp. on Human Pathogens. *Nano Biomed Eng*, 5, 39-45.
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Retrato microbiológico género *Fusarium*. *Infectol*, 85-86.
- Thomas, A., Torres, E., Ramírez, A., & Zehe, A. (2015). Las nanopartículas – Nanomateriales de tantas aplicaciones asombrosas en nanomedicina y nanotecnología biomédica. *Internet Electronic Journal Nanociencia et Moletrónica*, 2315-2326.
- Thul, S., Sarangi, B., & Pandey, R. (2013). Nanotechnology in Agroecosystem: Implications on Plant Productivity and its Soil Environment. *Expert Opin Environ Biol*, 2.
- Tkach, V., Ojani, R., Zarei, E., Nechyporuk, V., Yagodynets, P., & Oliveira, S. (2015). Descripción matemática del desempeño electroanalítico de nanopartículas de derivados de níquel en la determinación cualitativa y cuantitativa de metanol. *Rev. colomb. cienc. quim. farm*, 5-15.
- Ul-Haq, I., & Ijaz, S. (2019). Use of Metallic Nanoparticles and Nanoformulations as Nanofungicides for Sustainable Disease Management in Plants. *Nanobiotechnology in Bioformulations*, 289-316.
- USDA. (2003). Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems: a report submitted to cooperative state research, education and extension service. *Department of Agriculture, Washington, DC*.
- Valdés, E. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Agroecosistemas*, 254-264.
- Vásquez, L., & Castaño, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. SNYDER & H.N. HANSEN]: una revisión. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 363-374.



- Vera, I., & Esparza, I. (2016). Metodologías para Evaluar el Efecto de Nanopartículas en el Control de Hongos y Bacterias Fitopatógenos. *Agronano Tecnología*, 263-273.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H., Basurto, M., Soto, J., & Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 194-205.
- Villaverde, J. (2018). *Todo sobre Fusarium*. Obtenido de <https://plantamus.com/blog/todo-sobre-fusarium/>
- Viñanzaca, E. (2019). *Síntesis solvotermal de nanopartículas de cobre, su encapsulación en la matriz quitosano/capsaicina y estudio de liberación*. Obtenido de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32699/1/Trabajo%20de%20titulaci%C3%B3n.pdf>
- Visagie, C., Houbraken, J., Frisvad, J., Hong, S., Klaassen, C., Perrone, G., . . . Samson, R. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371.
- Virkutyte, J., & Varma, R. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles: biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. *Chemical Science*, 2 , 837-846.
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 1227-1249.
- Xie, Y., He, Y., Irwin, P., Jin, T., & Shi, X. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2325–2331
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño . *Mundo Nano*, 1-14.
- Zhang, Z., Chen, Y., Li, B., Chen, T., & Tian, S. (2020). Reactive oxygen species: A generalist in regulating development and pathogenicity of



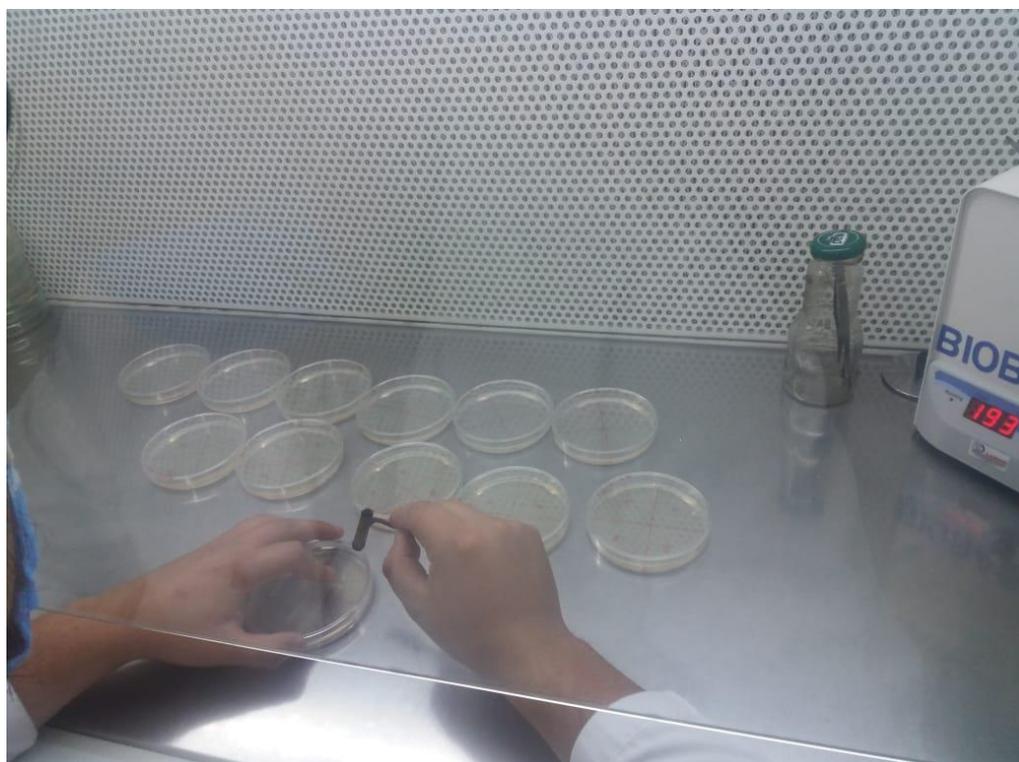
phytopathogenic fungi. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3344-3349.

ANEXO 3. Establecimiento de ensayos



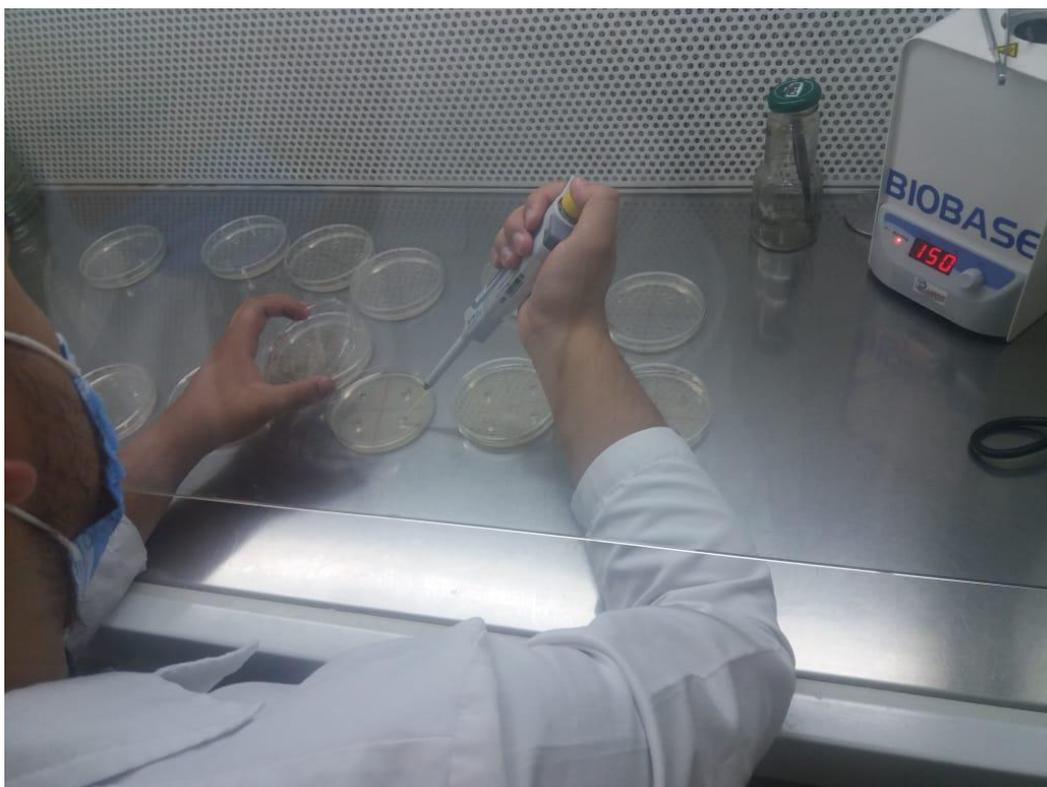
División de las placas Petri

ANEXO 4. Establecimiento de ensayos.



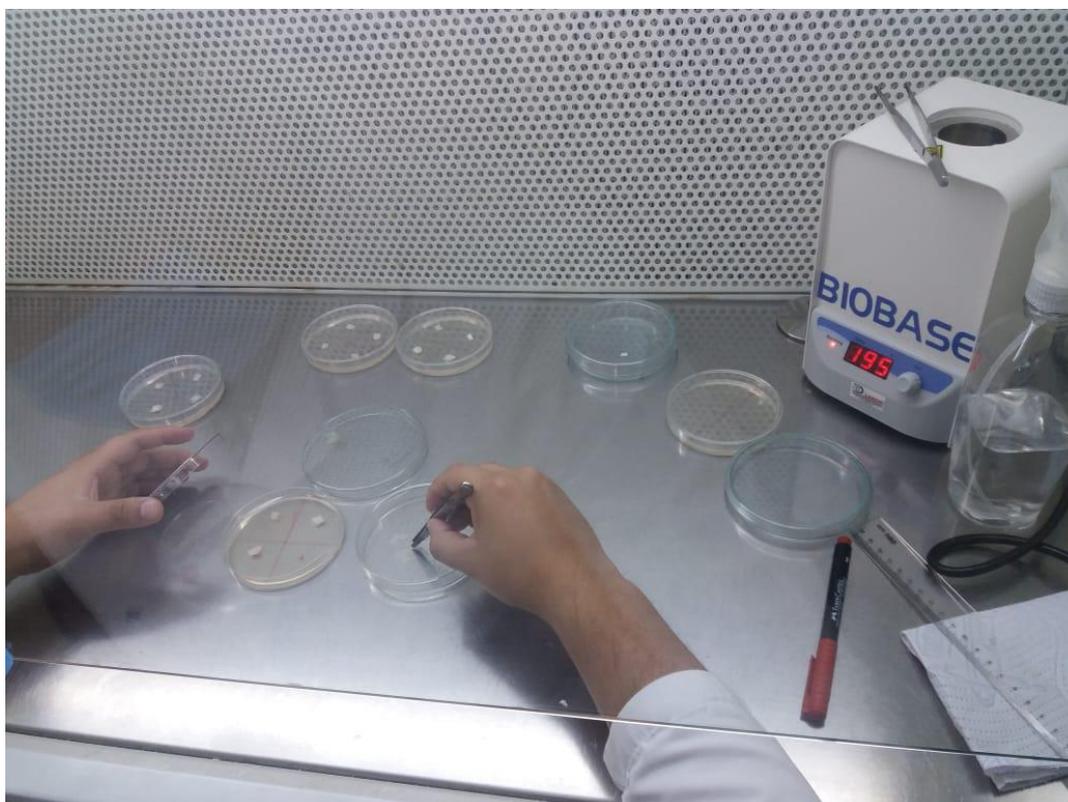
Marcado de los pocillos.

ANEXO 5. Establecimiento de ensayos.



Colocación de la solución en los pocillos.

ANEXO 6. Establecimiento de ensayos.



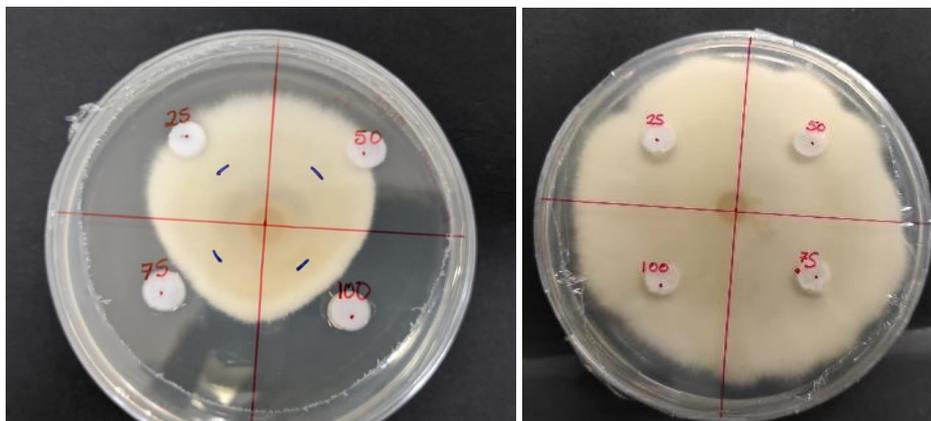
Colocación de nanofibras.

ANEXO 7. Establecimiento de ensayos.



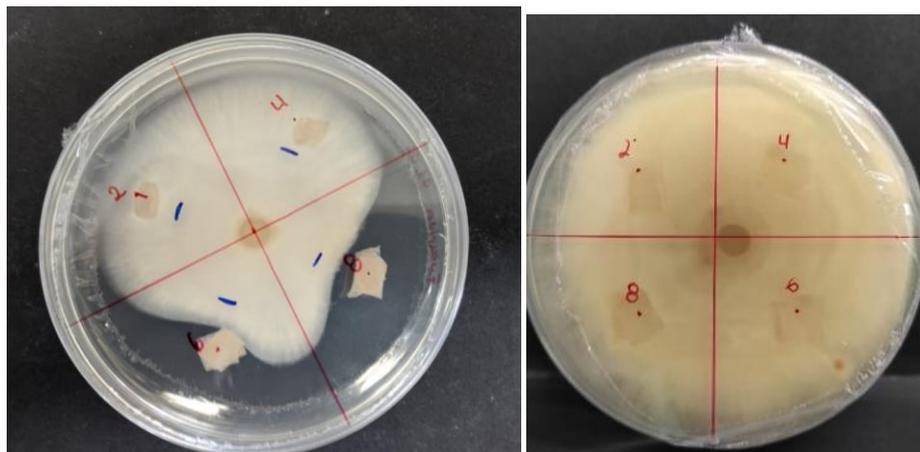
Inoculación de las cepas de *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*

ANEXO 8. Registro de datos.



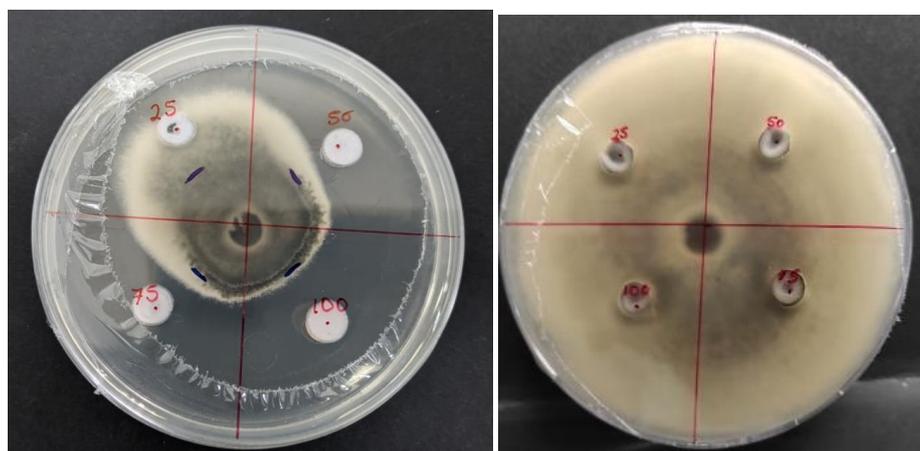
Toma de datos del diámetro de crecimiento de la cepa *Fusarium sp.* con diferentes concentraciones de solución y de su control.

ANEXO 9. Registro de datos.



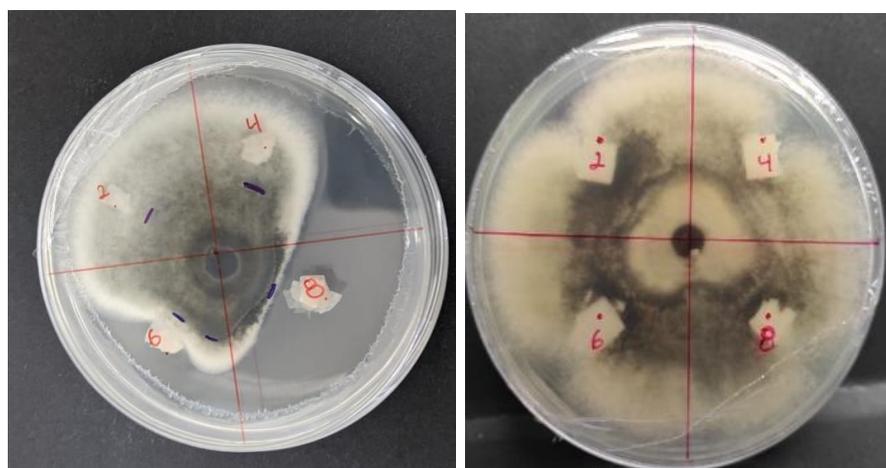
Toma de datos del diámetro de crecimiento micelial de la cepa *Fusarium* sp. con diferentes números de capas de nanofibras y de su control.

ANEXO 10. Registro de datos.



Toma de datos del diámetro de crecimiento micelial de la cepa *Penicillium* sp. con diferentes concentraciones de solución y de su control.

ANEXO 11. Registro de datos.



Toma de datos del diámetro de crecimiento micelial de la cepa *Penicillium* sp. con diferentes números de capas de nanofibras y de su control.