

**EVALUACIÓN *in-vitro* DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE CEPAS DE *Phoma sp.* y *Erythricium
salmonicolor*, AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES EN EL CAFETO
(*Coffea arabica L.*)**

**PAOLA ANDREA ARCINIEGAS GRIJALBA
MELISSA CAROLINA PATIÑO PORTELA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN-CAUCA
2015**

**EVALUACIÓN *in-vitro* DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE CEPAS DE *Phoma sp.* y *Erythricium
salmonicolor*, AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES EN EL CAFETO
(*Coffea arabica L.*)**

**PAOLA ANDREA ARCINIEGAS GRIJALBA
MELISSA CAROLINA PATIÑO PORTELA**

Trabajo de grado
Para optar al título de Biólogo

Directora
Lyda Patricia Mosquera Sánchez. Esp.

Co-director
Jorge Enrique Rodríguez Páez. Ph.D.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN-CAUCA
2015**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del Director

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Ciudad y Fecha de sustentación: Popayán ____ de ____ de ____

Gracias a Dios, por darme la fortaleza, la esperanza, y por ser mí guía en todo momento, pues ha gratificado mi camino colocando especiales y excelentes personas, que han contribuido en la finalización exitosa de este proyecto.

A mis padres por su inmenso sacrificio, apoyo y cariño en este proceso de mi formación profesional.

A mí querido hermano Jorge, por su ejemplo de disciplina y responsabilidad, y por darme la alegría de tener a mí linda sobrina, Victoria.

A mí abuelo Porfirio por su gran amor y de igual manera a mi abuela Satoria Vallejo, que aunque ya no está en esta tierra, le recuerdo y le agradezco por inculcar en mí, grandes valores.

A mi tía Rosa y su familia por su enorme cariño ya que han influido positivamente en mi vida personal y profesional.

A mi compañera de Trabajo de Grado, Melissa Patiño, por su amistad y por compartir conmigo la experiencia en todo este proceso de aprendizaje y tener hoy la satisfacción de haber hecho esta meta una realidad.

A mi querido novio, Miller Gálvez, una persona muy especial en mi vida, la cual me ha acompañado en este sueño y me ha brindado su paciencia, amor, consejo y apoyo incondicional para el logro de esta meta.

A mis compañeros y amigos de la universidad, con los cuales he compartido buenos momentos y han contribuido positivamente en mi formación personal y profesional.

Este trabajo está dedicado a Dios, por darme la vida y ser mi guía en momentos adversos, por llenarme de fe y fortaleza para alcanzar esta meta y por rodearme siempre de personas que me brindaron su sincera amistad.

A mi amado Carlos Miguel, por su amor, paciencia, apoyo y comprensión, porque los dos somos uno y mis triunfos son suyos.

A mi adorado hijo Miguel Santiago quien es y será mi fuente de inspiración y motivación para seguir formándome como madre y profesional para brindarle lo mejor y hacer de él un hombre de bien.

A mis padres José Manuel y Claudia, en especial a mi madre por su amor e incondicional apoyo, por su gran sacrificio y porque creyeron en mí.

A mi abuelita Clemencia, por su gran amor y apoyo.

A mis hermanos Sussan, José Manuel y Paula, por apoyarme, por darme una voz de aliento en momentos difíciles y por regalarme la alegría de tener a mis bellos y amados sobrinos.

A mi compañera y gran amiga Paola Arciniegas, por su paciencia y comprensión, por compartir momentos especiales, por escucharme y ser mi cómplice y porque Dios nos puso juntas en el camino y nos dio sabiduría para culminar exitosamente nuestro trabajo de grado.

A mi amiga y directora de tesis Patricia Mosquera por guiarnos y transmitirnos su conocimiento.

A la familia de mi esposo por acogerme y hacerme sentir como una hija más.

A mis amigos y compañeros de universidad que de una u otra manera contribuyeron en mi formación como profesional, compartiendo momentos inolvidables... los quiero.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Cauca, al Departamento de Biología y al Cuerpo de profesores, por brindarnos la formación académica para lograr el título de profesionales.

A la Unidad de Microscopía Electrónica, por acogernos y por permitirnos realizar la mayor parte de nuestro trabajo experimental.

Al Grupo de Investigación CYTEMAC por su colaboración en el préstamo de sus equipos.

Al laboratorio de Biología y de Inmunología, por permitirnos desarrollar actividades necesarias para la realización de nuestro trabajo de grado.

A nuestra querida directora Patricia Mosquera, por su incondicional apoyo, sus consejos, su cariño y por transmitirnos sus conocimientos tanto científicos como personales para guiar nuestro proceso de formación.

A nuestro Codirector, Jorge Rodríguez por su gran compromiso, entrega y apoyo en la realización de este proyecto, y por crear en nosotras la motivación seguir adelante, con nuestra formación profesional.

Al profesor Jimmy Guerrero, por su asesoría y colaboración en la parte estadística de nuestro trabajo de grado.

Al Doctor Álvaro Gaitán por sus sugerencias y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, a las personas que contribuyeron en el desarrollo de este proyecto: Nubia, Miler, Alex, Julián M, Cenayda, Jonathan, Julián, Carolina, Eliza y Yasser Ochoa.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	15
1. JUSTIFICACIÓN E IMPACTO AMBIENTAL	17
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 GENERALIDADES DE <i>Phoma sp.</i>	19
2.1.1 Clasificación taxonómica.	20
2.1.2 Síntomas de la enfermedad.	20
2.1.3 Procesos de infección.	21
2.2. GENERALIDADES DE <i>Erythricium salmonicolor.</i>	22
2.2.1 Clasificación taxonómica.	22
2.2.2 Síntomas de la enfermedad.	23
2.2.3 Proceso de infección.	23
2.3. NANOTECNOLOGÍA COMO CONTROL FITOPATOLÓGICO.	24
2.3.1 Nanopartículas sintetizadas y su potencial uso en remediación medioambiental.	25
2.3.2 Algunas aplicaciones de las ZnO-NP en remediación medioambiental	26
3. ANTECEDENTES	29
4. OBJETIVOS	32
4.1. OBJETIVO GENERAL	32
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32

5. MARCO METODOLÓGICO.....	33
5.1 CONDICIONES ADECUADAS PARA REPLICAR LAS CEPAS DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS <i>Phoma sp.</i> Y <i>E. salmonicolor</i>.	33
5.2. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA OBTENER LAS ZnO-NP MEDIANTE RUTAS QUÍMICAS.	34
5.2.1 Síntesis química de ZnO-NP.	34
5.2.2 Caracterización de las ZnO-NP.	35
5.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL COMPUESTO DE ZnO-NP EN LA SIEMBRA <i>IN-VITRO</i> DE <i>Phoma sp.</i> y <i>E. salmonicolor</i>....	37
5.3.1 Preparación del inóculo fúngico y bioensayos en medio de cultivo + ZnO-NP.....	37
5.3.2 Porcentaje (%) de inhibición.	39
5.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS DAÑOS MORFOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN EL HONGO POR MEDIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (MOAR) Y DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (MET).	40
5.4.1 Procesamiento y preparación de las muestras.	40
5.4.2 Microscopia óptica de alta resolución (MOAR)	41
5.4.3 Microscopia electrónica de transmisión (MET)	42
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1 CONDICIONES ADECUADAS PARA REPLICAR LAS CEPAS DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS <i>E. salmonicolor</i> Y <i>Phoma sp.</i>	44
6.2 SÍNTESIS QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ZnO-NP	45
6.2.1 Espectroscopia IR (FT-IR).	48
6.2.2 Difracción de rayos X (DRX).	51
6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE ZnO-NP EN LA SIEMBRA <i>IN-VITRO</i> DE <i>E. salmonicolor</i> Y <i>Phoma sp.</i>	52
6.3.1 <i>E. salmonicolor</i> con el sistema de ZnO-NP 0.15 /400	52
6.3.2 <i>E. salmonicolor</i> con el sistema ZnO-NP 0.1/600	57

6.3.3 <i>Phoma sp</i> con el sistema ZnO-NP 0.1/600.....	61
6.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS DAÑOS MORFOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN EL HONGO POR MEDIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (MOAR) Y DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (MET).....	66
6.4.1 Cambios morfológicos de <i>E. salmonicolor</i> y <i>Phoma sp.</i> observados con MOAR.	66
6.4.2 Cambios Ultraestructurales de <i>E. salmonicolor</i> y <i>Phoma sp</i> observados con MET.	68
7. CONCLUSIONES.....	73
8. RECOMENDACIONES.....	75
9. BIBLIOGRAFIA.....	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Daño ocasionado por *Phoma sp.* en la zona de crecimiento de la planta: (A) brotes terminales, (B) ramas, y (C) hojas [23].**21**
- Figura 2.** Daños causados por *E. salmonicolor* en zona productiva de la planta: (a) Ramas terminales y (b) aspecto de paloteo severo en el árbol [7].**23**
- Figura 3.** inoculación del micelio en los medios de cultivo.**34**
- Figura 4.** Ilustración de cómo se realizó el ensayo: (A) La dispersión de los tratamientos en los medios de cultivo, empleando ultrasonido, (B) Disposición de los medios de cultivo con los tratamientos en las cajas de petri, (C, D y E) La inoculación del disco de micelio y (F) Disposición del experimento final por triplicado.**38**
- Figura 5.** Crecimiento miceliar de (A) *E. salmonicolor* y (B) *Phoma sp.* a los 16 días.**44**
- Figura 6.** Micrografías de las Nanopartículas ZnO-NP 0.15/400 observadas con MET. El tamaño de estas nanopartículas se encontraba en el rango entre 20 y 35 nm.**46**
- Figura 7.** Micrografía de las Nanopartículas de ZnO-NP 0.1/600 observadas con MET. El tamaño de las nanopartículas se encontraba en el rango entre 30 y 45 nm.**47**
- Figura 8.** Color de los polvos de las ZnO-NP obtenidas después del tratamiento térmico (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.**48**
- Figura 9.** Espectros IR correspondientes correspondientes a las muestras: (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.**49**
- Figura 10.** Espectros IR entre 1200 y 400 cm^{-1} correspondientes a las muestras: (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.**50**

Figura 11. Difractogramas correspondientes a las muestras: (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.51

Figura 12. Actividad antifúngica de las ZnO-NP 0.15/400 sobre el crecimiento micelial de *E. salmonicolor* considerando diferentes concentraciones de estas nanopartículas.57

Figura 15. Imagen de las estructuras hifales de *Phoma sp.* (A) Testigo, (B) Tratamiento con el fungicida y (C) Tratamiento con una concentración 12 mmol.L⁻¹ de ZnO-NP 0.1/600.68

Figura 16. Micrografía electrónica de transmisión de *E. salmonicolor*. (A) Testigo, donde se observan: vacuolas (V), mitocondrias (Mit), pared celular (Pc) y citoplasma (Cit) (B) Tratamiento con el fungicida, se distingue la presencia de vacuolas, sus demás organelos no son visibles, (C) con el tratamiento de ZnO-NP 0.15/400 (9 mmol.L⁻¹), donde se observa un engrosamiento (Pc) y (D) ZnO-NP 0.15/400 (12 mmol.L⁻¹) un desprendimiento de la pared celular.70

Figura 17. Micrografía electrónica de transmisión de *Phoma sp.* (A y B) Testigo, (C) Tratamiento con el fungicida, donde se observan: nucleo (N), nucléolo (Nu), pared celular (Pc), citoplasma (Cit), número pequeño de vacuolas (V) y mitocondrias (Mit), y (D y E) con el tratamiento de ZnO-NP 0.1/600 (12 mmol.L⁻¹), donde se observan: septos (S), incremento en el número de vacuolas (V), citoplasma (Cit) y un aumento de la red fibrilar (Rf) alrededor de la pared celular (Pc).71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Crecimiento micelial macroscópico del hongo <i>E. salmonicolor</i> a los 16 días de edad: (a) Testigo, (b) Tratamiento con el Fungicida y (c) Tratamiento con una concentración 9 mmol.L ⁻¹ de nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.15/400.....	53
Tabla 2. Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento micelial de <i>E. salmonicolor</i> cuando se usaron nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.15/400 en los tratamientos.....	55
Tabla 3. Crecimiento micelial macroscópico del hongo <i>E. salmonicolor</i> a los 10 días de edad: (a) Testigo, (b) Tratamiento con el Fungicida y (c) Tratamiento con una concentración 12 mmol.L ⁻¹ de nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600.....	58
Tabla 4. Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento micelial de <i>E. salmonicolor</i> cuando se utilizaron nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600 en los tratamientos.....	59
Tabla 5. Crecimiento micelial macroscópico del hongo a los 16 días de edad. (a) Testigo, (b) Tratamiento con el Fungicida y (c) Tratamiento con una concentración 12mmol.L ⁻¹ de nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600.	62
Tabla 6. Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento micelial de <i>Phoma sp.</i> cuando se utilizaron nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600 en los tratamientos.....	63

GLOSARIO

ACICULAR: forma de aguja.

APRESORIO: estructura adhesiva, achatada, a partir de la cual se origina una hifa para la infección de una célula epidérmica del huésped.

HIFAS: unidad vegetativa en la estructura de los hongos.

HIALINA: término utilizado en biología para referirse a una característica transparente o traslúcida.

BASIDIOS: estructura microscópica productora de esporas.

BANDAS GAP: banda de energía, entre la banda de valencia y la banda de conducción.

ELECTRODENSO: las regiones de la muestra que bloquean, dispersan o difractan los electrones se representan por áreas oscuras.

LICUEFACCIÓN: hinchazón o desintegración del citoplasma.

NANOPARTÍCULA: estructura microscópica que tiene una dimensión del orden de entre 1 y 100 nm.

TEXTURA AFELPADA: produce micelio aéreo bajo, con aspecto de felpa y terciopelo.

TEXTURA GLABROSA: no producen micelio aéreo, por lo tanto tienen una superficie pareja.

RESUMEN

El objetivo principal de este proyecto de investigación fue obtener información sobre la capacidad antifúngica *in-vitro* de las nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnO-NP), considerando su acción sobre dos enfermedades de interés para el sector cafetero: La Muerte Descendente del Cafeto (*Phoma sp.*) y Mal Rosado (*Erythricium salmonicolor*). Inicialmente, se estructuró una metodología de síntesis que permitió obtener las ZnO-NP de manera controlada y reproducible. Estas nanopartículas fueron caracterizadas usando Espectroscopia Infrarrojo (FT-IR), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y Difracción de Rayos X (DRX). Para estudiar la inactivación del crecimiento micelial del hongo, se usaron concentraciones de: 3, 6, 9 y 12 mmol.L⁻¹ de ZnO-NP, concentraciones que se dispersaron en las cajas de petri, bajo condiciones de esterilidad, donde se sembró el hongo y se facilitó su crecimiento. El efecto inhibitorio del crecimiento del hongo, se determinó midiendo el área de crecimiento de los mismos con el sistema de imágenes "Image pro Analyzer". Para conocer el cambio en su morfología se hizo uso de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) y para observar los cambios en la ultraestructura se empleó MET. Los resultados mostraron que las ZnO-NP, en concentraciones mayores a 6 mmol.L⁻¹, inhibían, significativamente, el crecimiento de *E. salmonicolor*, mientras que para *Phoma sp.* fue la concentración de 12 mmol.L⁻¹. Por otro lado, en las imágenes de MOAR se observó como respuesta una deformación en las estructuras de crecimiento: adelgazamiento notable de las fibras de las hifas y tendencia al agrupamiento. Finalmente, las imágenes de MET evidenciaron una licuefacción del contenido citoplasmático, haciéndolo menos electrodensos con presencia de algunas vacuolas (V) y un notable desprendimiento de la pared celular (Pc). La realización de esta investigación ha permitido verificar que las ZnO-NP si presentan un efecto antifúngico sobre el crecimiento micelial in vitro de los hongos *Phoma sp.* y *E. salmonicolor*,

Palabras claves: antifúngica, nanopartículas, óxido de cinc, patógenos

INTRODUCCIÓN

El café, en términos de actividad comercial, es el segundo recurso más importante después del petróleo, actualmente la producción mundial es de 6,3 millones de toneladas anuales [1]. En Colombia, la producción de café alcanzó los 10,9 millones de sacos, 41% más que lo registrado durante 2012 [2], lo cual convierte a este producto agrícola en una fuente vital para el crecimiento económico y el desarrollo industrial del país [3].

Por otro lado, en las plantaciones agrícolas de nuestro país, en particular en los cultivos de café, una de las causas de las diferentes enfermedades fitopatógenas son los hongos [4], entre ellos *Phoma sp.* y *Erythricium salmonicolor*. Estos causan graves enfermedades en los cafetos porque poseen el potencial de destruir enteramente las cosechas [5] reduciendo en forma crítica el rendimiento de la mayoría del cultivo, obligando a tomar medidas de emergencia las cuales aumentan los costos de producción

Específicamente, *Phoma sp.* es el causante de la Muerte Descendente del Cafeto y se manifiesta afectando tanto el tallo principal como las ramas laterales [6]; mientras que *E. salmonicolor*, causante de la enfermedad conocida como Mal Rosado, ocasiona el amarillamiento o marchitez del follaje, tallos y frutos, llevando a la muerte de la planta [7]. Aunque estos hongos no presentan resistencia a fungicidas, ha sido el cambio en las condiciones climáticas lo que ocasionó que las enfermedades que estos producen reemergieran con alta intensidad, lo que ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas de control químico y biológico, sin alterar el resultado final en la cosecha. Considerando, además, la creciente demanda de alimentos y consumibles con menores residuos de productos químicos de síntesis, buscando con esto la preservación del medio ambiente.

El uso de la nanotecnología empleando nanopartículas (NP) para el control de hongos fitopatógenos se constituye en un ejemplo de esta innovación, ya que

los materiales nanoparticulados han recibido una atención creciente debido a sus propiedades físicas y químicas únicas lo que ha propiciado aplicaciones potenciales en medicina y biología [8]. Estudios han mostrado la eficiente actividad antifúngica de diversos materiales de NP entre ellos la Plata [9], [10] el Cobre [11], [12] el Dióxido de Titanio [13] y el Óxido de Cinc.[14].

Considerando las necesidades que demanda la agricultura moderna, para el control de organismos patógenos y en base a los antecedentes bibliográficos, se propone el uso de nanopartículas de Óxido de Cinc (ZnO-NP) para evaluar su actividad antifúngica sobre los hongos *Phoma sp.* y *E. salmonicolor*, patógenos que actualmente afectan de manera limitante los cultivos de café.

1. JUSTIFICACIÓN E IMPACTO AMBIENTAL

Colombia es reconocida actualmente como el tercer país productor de café (*Coffea arabica L.*) en el mundo, ya que su producción es continua a lo largo del año, donde más del 95% está a cargo de caficultores de menos de 5 hectáreas [15].

La producción de café es la principal fuente de ingresos para más de 500.000 familias distribuidas en 590 municipios del país. A pesar del notorio descenso en la producción observado entre 2008 y 2012 como consecuencia del evento climático de la Niña y el resurgimiento de enfermedades, las exportaciones de este fruto se han incrementado alrededor del 27% en el último año [16], pero sigue latente el efecto de la variabilidad climática y su efecto en el comportamiento de las enfermedades y plagas que requieren una atención continua.

Por esta razón, aquellos inconvenientes que pueden alterar la producción del café, han ganado gran interés, especialmente los provocados por microorganismos como los hongos, los cuales han sido una de las principales causas de enfermedades en las plantas. La afectación por estos patógenos ha demostrado ser una considerable pérdida económica en cultivos de café, ya que su eficacia biológica y reproductiva ocasiona no solo pérdidas de producción económica, sino también pérdidas en la producción biológica, es decir, la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedadas [17].

Una de las zonas productoras de café en Colombia es el Departamento del Cauca, el cual se encuentra dividido en cuatro provincias, cada una de ellas con características culturales, climáticas y sociales diferentes. Entre estas se encuentran la Región de Tierra Dentro (Inza y Páez), la Región Norte (Santander de Quilichao, Jambaló, Toribío, Caloto, Corinto, Miranda, Suarez, y Buenos Aires), la Región de la Meseta de Popayán,(Popayán, Timbío, Totoró,

Sotará, Puracé, Piendamó, Caldono, el Tambo, Morales y Cajibío) y la Región Sur conformada, a su vez, en dos zonas; la Zona del Macizo, (Rosas, Almaguer, la Vega, la Sierra y San Sebastián) y la zona del Patía (el Bordo, Bolívar, Mercaderes, Balboa, Sucre, Florencia y Argelia) [18].

Hasta ahora el control de hongos patógenos ha presentado limitaciones porque eventualmente han desarrollado resistencia a muchos fungicidas químicos convencionales [19]. Asociado a esto el empleo inadecuado de los mismos, representa un peligro potencial, tanto para el ser humano como para el medio ambiente, ya que conlleva a la exposición y acumulación de productos tóxicos cuyos efectos no se limitan únicamente a controlar los organismos fitopatógenos, sino también a cualquier otro organismo sensible a estos productos [17]. Para superar estos inconvenientes es importante explorar nuevas alternativas antifúngicas, por ejemplo, implementar técnicas novedosas como la nanotecnología, mediante el uso de nanopartículas. Estas presentan propiedades que las han constituido en un objeto importante de estudio en los últimos años, en áreas como: las ciencias biológicas aplicadas y la medicina, entre otras [8]. Estas podrían sustituir, o sumarse a las que hasta ahora han sido las estrategias usadas para controlar las enfermedades en las plantaciones, acciones que ayudarían a los caficultores de nuestro Departamento a obtener mayores y mejores producciones de café, a reducir los costos de producción o a generar mayor valor agregado por la diferenciación de los métodos de obtención del grano, en especial en la región cafetera de la meseta de Popayán, ya que esta zona cuenta con el 65% de la producción del Departamento [18].

2. MARCO TEÓRICO

En Colombia, el café cuenta con una superficie apta para la producción de 7'300.000 hectáreas, aproximadamente el 6.4% del territorio nacional [20]. De acuerdo con la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, la actividad cafetera genera hoy uno de cada tres empleos rurales, ocupa 560 mil familias, y permite que dos millones de personas vivan directamente de la producción del grano. Con 631 mil empleos generados en el año, supera en 3,7 veces el total aportado por las flores, el banano, el azúcar y la palma juntos [21]. Sin embargo las condiciones geográficas y medioambientales favorables que se tienen para el cultivo, como: altas precipitaciones, constantes temperaturas y humedades relativas a lo largo del año también son propicias para la proliferación de diversos microorganismos fitopatógenos entre los cuales se encuentran: los virus, nematodos, viroides ,fitoplasmas, bacterias y hongos, siendo este último el grupo que más enfermedades ocasiona y por lo tanto sobre el que se han venido realizando investigaciones dependiendo en gran parte de la importancia económica de los cultivos o plantas que afectan [17].

Como ya se ha mencionado anteriormente, en este trabajo de investigación se consideraron dos enfermedades que son de importancia económica como: La Muerte Descendente del cafeto causada por el hongo *Phoma sp.* y Mal Rosado causada por *E. salmonicolor*.

2.1 GENERALIDADES DE *Phoma sp.*

La Muerte Descendente del cafeto en Colombia es ocasionada por especies del género *Phoma*, un deuteromicetes de la clase Coelomicetes, y del orden Sphaeropsidales [22]. Esta especie, afecta a cultivos localizados en altitudes superiores a los 1600 metros con regímenes de lluvias prolongados, baja

luminosidad y temperatura mínima baja inferior a los 20°C. *Phoma sp.* presenta picnidios oscuros, ostiolados, lenticulares a globosos, con dimensiones de 25-280 x 25-277 micras, con abundantes esporas o picnidiosporas de 1-5 x 1-6 micras uniceluladas, hialinas, ovoides a elongadas; micelio hialino, septado y ramificado similar a *P. costaricensis* [6].

2.1.1 Clasificación taxonómica.

Reino: Fungi

Phyllum: Deuteromycota

Clase: Coelomycetes

Orden: Sphaeropsidales

Familia: Sphaeropsidaceae

Género: *Phoma*

Especie: *Phoma sp.*[6]

2.1.2 Síntomas de la enfermedad.

El hongo afecta tejidos tiernos de hojas en desarrollo, brotes terminales tanto del tallo principal como de ramas laterales en los cuales penetra por estomas y/o por heridas. Las plantas afectadas presentan necrosis descendente de los tejidos en desarrollo, la cual avanza hasta el tejido lignificado donde se detiene [6]. Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan entre 4 y 9 días

después de la penetración del patógeno; estos corresponden a pequeñas manchas cloróticas de forma irregular que coalescen formando manchas que a los 10 días no es posible individualizar [23].



Figura 1. Daño ocasionado por *Phoma sp.* en la zona de crecimiento de la planta: (A) brotes terminales, (B) ramas, y (C) hojas [23].

2.1.3 Procesos de infección.

La infección ocurre cuando las esporas, transportadas por el viento, germinan sobre los tejidos del hospedante y su tubo germinativo penetra por estomas o heridas formando un apresorio. Luego a partir de esta última estructura, se producen hifas de colonización que avanzan por los espacios intercelulares de la epidermis, invaden inter e intracelularmente el mesófilo y de allí colonizan los tejidos esponjosos y de empalizada. Las células afectadas se plasmolizan, los cloroplastos se aglutinan y se presenta el colapso total del tejido afectado donde se encuentran los picnidios del hongo [6].

2.2. GENERALIDADES DE *Erythricium salmonicolor*.

El Mal Rosado del cafeto, es una enfermedad ocasionada por el hongo *E. salmonicolor* de común ocurrencia en cafetales colombianos, especialmente en la etapa productiva y durante la época de mayor precipitación pluvial [24]. *E. salmonicolor* tiene un amplio rango de hospedantes, ataca cerca de 141 especies de plantas, entre las que están: los cítricos, mango, aguacate, níspero, caucho, cacao, té, veraneras y eucalipto.

2.2.1 Clasificación taxonómica.

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Basidiomicetos

Subclase: Holobasidiomycetidae.

Orden: Exobasidiales

Género: *Erythricium*

Especie: *Erythricium salmonicolor* [25]

2.2.2 Síntomas de la enfermedad.

Los cafetos afectados por *E. salmonicolor* “mal rosado” sobresalen incluso a distancia ya que las partes terminales de las ramas aparecen con el follaje amarillento, marchito o seco. Las ramas afectadas dan la apariencia de haber sido quemadas, de ahí el nombre común de “brasa o quema” (figura 2) [26]. La primera evidencia del ataque de este patógeno corresponde a la aparición de un crecimiento fúngico de tono blanquecino localizado en la parte inferior de las ramas productivas [27]. En los frutos, ramas y hojas cubiertas por este hongo se observan agrupaciones de micelio que dan inicio a la necrosis o muerte de los tejidos infectados; el micelio cubre progresivamente los frutos hasta momificarlos completamente, causando su caída y generando un aspecto de paloteo severo en el árbol [7].



Figura 2. Daños causados por *E. salmonicolor* en zona productiva de la planta: (a) Ramas terminales y (b) aspecto de paloteo severo en el árbol [7].

2.2.3 Proceso de infección.

El proceso de infección del hongo ocurre en tres estados: inicialmente el estado micelial caracterizado por un tenue crecimiento de micelio blanco formando una

especie de telaraña [27], seguido se observa el estado de pústula estéril con presencia de esclerocios que son agregados miceliales en forma de mota de algodón que va del color blanco al rosado salmón [28] y finalmente el estado más avanzado se caracteriza por un abundante crecimiento micelial a partir del cual, ocurre la formación de basidios y producción de basidiosporas; las ramas y los frutos pueden secarse como consecuencia del taponamiento de los haces vasculares [24]. Su ciclo de vida tiene una duración aproximada de 40-45 días, a partir del estado micelial al estado esclerocial transcurren de 10 a 15 días y de este al estado de costra rosada 20-25 días, el periodo de latencia puede durar desde 30-35 días [29].

2.3. NANOTECNOLOGÍA COMO CONTROL FITOPATOLÓGICO.

La nanotecnología considera la manipulación y uso de la materia a escala de entre 1 y 100 nanómetros, acciones que se espera reporten beneficios promisorios a las sociedades presentes y futuras. Entre sus campos de aplicación se incluyen: medio ambiente, agricultura, cosmética, higiene y salud pública, entre otras [30]. Esta tecnología se remonta a finales del siglo pasado, aunque algunos insumos de la misma se utilizaron en épocas antiguas, y se anunció oficialmente en Estados Unidos en el 2000 [31]. En Colombia, la inversión en nanotecnología y biotecnología es muy poca, hasta el año 2005, el presupuesto nacional no había aportado recursos a este campo del conocimiento. Pese a que no existe una política nacional que fomente el desarrollo del mismo, el país ha venido incursionando en ella a través de actividades de investigación que vienen desarrollando algunas instituciones en el campo de la nanotecnología, con un objetivo específico de brindar soluciones a nivel ambiental [32].

Por otro lado, está bien documentado que la mayoría de los microorganismos patogénicos son capaces de desarrollar una alta resistencia a muchos

fungicidas convencionales y desinfectantes; asociado a esto, el empleo inadecuado de los mismos, como la dosificación, da como resultado contaminación para el suelo, agua, aire y de los productos agrícolas, además de ser potencialmente dañinos para la salud humana y de los animales [33]. Esto ha llevado a considerar cambios en las técnicas de producción agrícola, como es el caso del uso de la nanotecnología, concretamente de las nanopartículas, como alternativa antifúngica en los sistemas de producción y protección para los cultivos.

2.3.1 Nanopartículas sintetizadas y su potencial uso en remediación medioambiental.

Recientemente, diversas nanopartículas se han sintetizado y ensayado para determinar su actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos. La gran mayoría de estas nanopartículas son óxidos metálicos, tales como: Óxido de Cinc, Dióxido de Titanio, Óxido de Magnesio y metales como la Plata [34]. Los resultados obtenidos han mostrado que estas nanopartículas presentaban esta funcionalidad y eran especialmente atractivas debido a su pequeño tamaño, gran relación de superficie-volumen y propiedades físico-químicas modificables [35]. Además, algunos óxidos metálicos, como: el Óxido de Cinc y el Dióxido de Titanio, son muy estables y tienen una vida media más larga que los desinfectantes con base orgánica [36].

Al considerar la aplicación de estas nanopartículas semiconductoras, como material antifúngico, normalmente se hace uso de la fotocatalisis para propiciar capacidad fotodegradante a las NP. En la fotocatalisis, los fotones que tengan una mayor energía que la correspondiente a la banda prohibida del semiconductor (banda "gap") serían absorbidos para dar inicio a algunos procesos y transformaciones químicas, entre ellos la generación del par electrón (e^-) - hueco (h^+) que es un evento muy rápido, del orden de los

femtosegundos, y que ocurre a través de un estado excitónico, enlace $e^- - h^+$, cuya estabilidad varía con la naturaleza del semiconductor y es difícil de caracterizar [37]. Considerando que la luz solar es la fuente de excitación ideal, para propiciar la fotocatalisis, la búsqueda de semiconductores con una banda “gap” adecuada para aprovechar la radiación solar es muy importante. Para promover algunas transformaciones químicas, las cargas fotogeneradas (e^- y h^+) deben alcanzar la superficie y ser transferidas a las especies adsorbidas, acción que requiere la interacción entre las bandas del semiconductor con los estados localizados de las moléculas adsorbidas. Sin embargo, la separación de electrones y huecos es estable solamente por unas décimas de nanosegundo porque ellos se aniquilan a través del proceso de recombinación. Es por ello que, para mejorar la capacidad fotodegradante del material, se debe propiciar la separación de las cargas fotodegradantes.

2.3.2 Algunas aplicaciones de las ZnO-NP en remediación medioambiental

Ya que las ZnO-NP son las partículas de interés para este trabajo, es necesario mencionar que se encuentran entre las nanopartículas de óxidos metálicos más utilizadas en procesos para la obtención de diversos productos, por ejemplo: materiales eléctricos, sensores de gases, dispositivos optoelectrónicos entre otros. Una de las características más importantes, de estas partículas son sus propiedades ópticas, lo que ha generado gran expectativa sobre su potencial uso en aplicaciones relacionadas con la absorción de radiación UV. Esto ha llevado a su incorporación en revestimientos para controlar la radiación UV y como antimicrobianos [38]; algunos de sus usos están relacionados con su incorporación en productos de cuidado personal, tales como: cremas anti-envejecimiento para las manos y protectores solares [39].

Cabe destacar que, para el desarrollo de este proyecto de investigación, se hizo uso de ZnO-NP ya que éstas exhiben algunas ventajas en comparación

con otras nanopartículas: el coste de su obtención es bajo, a través de métodos de síntesis sencillos, y las propiedades físicas y químicas que ellas presentan son únicas [40]. Algunas de las propiedades físicas de las ZnO-NP están relacionadas con el valor de su gap de energía, alrededor de (3,37 eV), lo que significa que es relativamente fácil llevar un electrón de una banda a otra, y porque, además, exhiben una alta energía de enlace $e^- - h^+$ (60 MeV) [41]. Estas propiedades les permiten absorber radiación electromagnética en casi todo el espectro UV (200-400 nm).

Al considerar la actividad antibacteriana de las ZnO-NP, aunque el mecanismo no está completamente estructurado, serían los electrones libres y los huecos, de manera directa, los que propiciarían reacciones de óxido – reducción, que tomarían como blanco la pared celular y propiciarían la modificación de la permeabilidad de la membrana. Otra alternativa considera la actividad fotocatalítica de las ZnO-NP. Cuando sobre este óxido se hace incidir radiación con energía de igual valor mayor al del “gap” de energía (3.37 eV equivalente a 368 nm) se propicia la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por su sigla en inglés), entre ellas radicales OH y “super oxígeno” (O_2^-), siendo estas especies las que ocasionarían el rompimiento de la pared celular en las bacterias, por ejemplo varios estudios indican que la integración de ZnO-NP, en cultivos de células bacterianas, indujeron la liberación continua de lípidos y proteínas de la membrana, lo que modificaría la permeabilidad de la membrana bacteriana, propiciando la inactivación de la misma [42, 43]. Trabajos previos han mostrado que la toxicidad de las ZnO-NP aumentaba significativamente al someterlas a la radiación natural del sol [44, 45], tal que las nanopartículas de ZnO, con tamaño entre 60 y 100 nm bajo la luz natural del sol, ocasionaron mortalidad en los nematodos *C. elegans*, lo que no ocurrió bajo la luz del laboratorio en condiciones de oscuridad [46]. Por otro lado, cuando se trabaja en sistemas acuosos o en aquellos donde haya posibilidad de disolución de las ZnO-NP, y por lo tanto la generación de Zn^{2+} en el medio, se deberían considerar dos efectos para analizar la toxicidad del ZnO: los dependientes de la partícula y los propiciados por el Zn^{2+} disuelto, mecanismos que tendrían diferentes formas de acción tal como lo demostraron Poynton *et. al* trabajando

con el *D. magna* [47]. Otros factores que afectarían la solubilidad de las ZnO-NP, y por lo tanto la contribución de los iones Zn^{2+} a la toxicidad del óxido, serían: la presencia de ciertos aniones, Cl^- y SO_4^{2-} por ejemplo [48], la temperatura [49], la presencia de materia orgánica, muy importante para nuestro estudio [50], y la existencia de fosfato en el medio ya que esta especie química propiciaría procesos de re-precipitación del Zn^{2+} disuelto y/o transformaciones estructurales, que modificarían la toxicidad del ZnO-NP, tal como lo indican Li et.,al.[51] y Reed et.,al.[49] en sus trabajos. Pero no siempre la toxicidad de las ZnO-NP se puede justificar considerando la disolución de las partículas y la liberación de Zn^{2+} y es necesario considerar los efectos inducidos por la nanopartícula [48], [52], [53]. Aunque no hay un consenso sobre el mecanismo exacto que genera la toxicidad inducida por la nanopartícula, lo más aceptado es que este tipo de toxicidad es mediado, usualmente, por los ROS que se generarían en la superficie de la partícula. Estas especies se pueden producir como resultado de las propiedades electrónicas del material semiconductor y/o la capacidad de ciertos materiales de perturbar los procesos de transferencia electrónica en sistemas biológicos, como podría ocurrir en la membrana mitocondrial interna [54], así como debido a la reacción de la superficie del ZnO con el agua produciendo radicales hidroxilo (OH) [55] o a la generación de H_2O_2 [56].

Aunque los mecanismos mencionados anteriormente fueron propuestos, principalmente, para la inactivación de bacterias, He et., al. [19] y Liu et., al [57] indicaron que para el caso de la inactivación de hongos, estos podrían no ser los mismos, aún más, se deberían plantear mecanismos distintos para hongos diferentes: uno para el *Botrytis cinerea* y otro para el *Penicillium expansum*, como lo hicieron en su trabajo [18], utilizando la espectroscopia Raman. Estos últimos mostraron que en los espectros de Raman, correspondientes al hongo *B. cinerea*, la intensidad de las bandas asociadas a los ácidos nucleicos y a los carbohidratos aumentó significativamente, cuando fueron tratados con ZnO NP, lo que no ocurrió con las bandas de las proteínas y lípidos. Estos resultados sugieren que las ZnO-NP pudieron afectar las funciones celulares y, finalmente, causar el aumento del contenido de ácidos nucleicos.

3. ANTECEDENTES

Debido a que la producción de café es una fuente dinamizadora y un generador estratégico de riqueza del país, es indispensable buscar alternativas para el control de las enfermedades que provocan la pérdida de gran parte de la producción cafetera. Por lo tanto es importante reseñar que, dados los estudios que se han realizado sobre la capacidad antifúngica de las ZnO-NP, esto ha llevado a considerar su uso como un método alternativo respetuoso del medio ambiente y de bajo costo, para controlar microorganismos patógenos, sin embargo cabe mencionar que en la revisión bibliográfica realizada hasta el momento, no se han reportado estudios sobre la capacidad antifúngica específicamente sobre los hongos de interés para esta investigación.

En el 2010 Nair, *et. al.* [58] mostraron que el uso de diversas NP en medicina, en condiciones *in-vitro*, presentaba cierto interés para la agricultura, considerando la liberación controlada de fungicidas en el control de enfermedades en las plantas. Además, procesos como la nanoencapsulación de materiales biodegradables mostraron beneficios para un uso más eficiente y un manejo más seguro de los plaguicidas con menor exposición al medio ambiente garantizando ecoprotección. En concreto, la aplicación de nanotecnología en fitopatología es una alternativa promisoriosa para la protección de los cultivos.

En el 2010 Sharma, *et. al.* [59] estudiaron las propiedades antifúngicas de las nanopartículas de ZnO, sintetizadas con y sin el uso de surfactantes, bajo diferentes condiciones de reacción sobre cepas del hongo *Fusarium sp.* La actividad antifúngica de estas NP, se estudió midiendo el diámetro de los hongos que fueron cultivados en cajas de petri sin y con el tratamiento de NP y se compararon con el agente antifúngico tradicional (sulfato de cobre). Los resultados encontrados indicaron que su actividad depende tanto de la concentración como del tamaño de las NP, esta última característica fue determinada por las diferentes condiciones de reacción utilizadas durante la

síntesis de las mismas. La caracterización del tamaño y la morfología de las NP se realizó por técnicas como: microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía infrarroja (FTIR).

Hacia el 2011 He, *et., al.* [19] comprobaron el efecto antifúngico de las ZnO-NP y sus modos de acción contra dos hongos patógenos postcosecha: *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. Para el estudio se utilizaron ZnO-NP con tamaños de 70 ± 15 nm y concentraciones de 3, 6, y 12 mmol.L⁻¹. Para evaluar la actividad antifúngica y caracterizar los cambios en la morfología y composiciones celulares de las hifas de los hongos, se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM) y la espectroscopia de Raman. Los resultados obtenidos por los investigadores mostraron que a concentraciones superiores a 3 mmol.L⁻¹ fue posible inhibir, significativamente, el crecimiento de estos patógenos y por otro lado las imágenes de SEM y los espectros de Raman, indicaron diferentes actividades antifúngicas contra *B. cinerea* y *P. expansum*, ya que inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* al afectar las funciones celulares, lo que causó deformación en las hifas de los hongos, en comparación con *P. expansum*, donde no hubo desarrollo de conidióforos y conidios, lo que finalmente llevó a la muerte de las hifas. Estos resultados sugieren que ZnO-NP podrían ser utilizadas como un eficaz fungicida en aplicaciones de seguridad agrícola y alimentaria.

En el 2013 Kairyte, *et., al.* [34] comprobaron la actividad antibacteriana de las ZnO-NP, contra patógenos humanos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y el hongo patógeno *Botrytis cinerea*. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) en bacterias indicaron que el tratamiento indujo a la desintegración de la pared celular mientras que para *B. cinérea* se produjeron múltiples alteraciones degenerativas en las cabezas conidiales y en la morfología de las hifas. Los datos sugieren que ZnO-NP en presencia de la luz visible exhiben una fuerte actividad antibacteriana y antifúngica, lo que indica que estas propiedades podrían ser potencialmente utilizadas para el desarrollo de fungicidas eficaces en la agricultura o agentes antibacterianos.

Más recientemente en el 2015 Esparza *et. al.* [60] evaluaron la actividad antifúngica de ZnO-NP sobre *Phytophthora sp* y *Rhizoctonia solani* en condiciones *in-vitro*. El estudio se realizó en medio de cultivo solido utilizando diferentes concentraciones de nanopartículas. Bajo un diseño completamente al azar, encontraron que las ZnO-NP tienen una acción antifúngica, ya que mostraron un efecto inhibidor significativo contra las dos cepas de hongos, provocando claros halos de inhibición. Las inhibiciones en *Phytophthora sp* fueron de 55.17 % y 46.8 % en *Rhizoctonia solani*. Según los resultados obtenidos se puede señalar que las NP metálicas de ZnO tienen un uso potencial como productos para prevenir y controlar el deterioro por microorganismos fitopatógenos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifúngico *in-vitro* del compuesto de Óxido de Zinc nanoparticulado (ZnO-NP) como método alternativo para el control de enfermedades ocasionadas por hongos como *Phoma sp.* y *Erythricium salmonicolor*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer las condiciones más adecuadas para replicar las cepas de los hongos *Phoma sp.* y *Erythricium salmonicolor*.

Definir las condiciones óptimas para obtener las ZnO-NP mediante rutas químicas.

Analizar el efecto antifúngico del compuesto de ZnO-NP en el cultivo *in - vitro* de *Phoma sp.* y *Erythricium salmonicolor*.

Identificar si las ZnO-NP ocasionan daños morfológicos y ultraestructurales en los hongos.

5. MARCO METODOLÓGICO

5.1 CONDICIONES ADECUADAS PARA REPLICAR LAS CEPAS DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Phoma sp.* Y *E. salmonicolor*.

Las cepas del hongo patógeno *Phoma sp.* fueron previamente obtenidas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Cauca, de muestras infectadas de hojas de cafeto donadas por la Estación San Joaquín de Cenicafé, municipio del Tambo-Cauca. Por otro lado las cepas de *E. salmonicolor* fueron donadas por el centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) localizado en Planalto, km 4 vía Chinchiná- Manizales.

Estas cepas fueron replicadas y cultivadas y para ello se prepararon medios adecuados para su cultivo en cantidad suficiente para tener buen material biológico como fuente de inóculo para el desarrollo del estudio, agar extracto de malta + tiamina, para *Phoma sp.* y base de papa dextrosa agar (PDA) + oxitetraciclina para *E. salmonicolor*. Estos medios fueron autoclavados a 121°C y posteriormente, bajo la cámara de flujo laminar, se sirvieron en cajas de petri estériles, de 100 mm de diámetro x 18 mm de alto, utilizando 20 mL de medio de cultivo en cada caja; finalmente, se incubaron por 3 días a 25 °C para garantizar su esterilidad, tal como lo recomienda el protocolo para este tipo de ensayos [61]. Pasados los tres días de incubación se realizó la siembra inoculando un disco de 1.5 cm de diámetro de micelio en el centro de cada caja de petri (Figura 3) y posteriormente estas cepas se incubaron hasta garantizar su crecimiento (25 días aproximadamente) bajo condiciones de laboratorio (25°C).

Los hongos se mantuvieron por medio de la técnica de resiembra periódica que permitió la supervivencia de los cultivos en cortos periodos de tiempo, la cual se basó en transferir el cultivo del medio seco o viejo a uno fresco

proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento nuevamente al hongo, lo que condicionó el elevado riesgo de contaminación y variabilidad de las características de las cepas, las cuales constituyen sus principales desventajas [62]

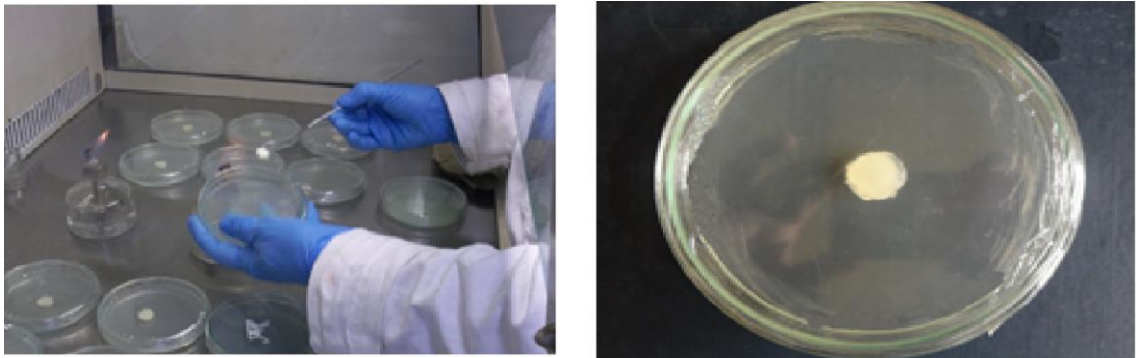


Figura 3. Inoculación del micelio en los medios de cultivo.

5.2. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA OBTENER LAS ZnO-NP MEDIANTE RUTAS QUÍMICAS.

5.2.1 Síntesis química de ZnO-NP.

Para sintetizar las nanopartículas de ZnO se utilizó la metodología sol-gel. Para ello se usaron 13.1694 g de Acetato de Zinc di-hidratado $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck), como precursor, y 0.07289 g de surfactante, Bromuro de Cetiltrimetil-Amonio $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3 \text{Br})$ Merck), que se empleó para controlar el crecimiento de las partículas. Para favorecer el proceso de nucleación de la fase sólida, se conformó una solución de etanol analítico (400 mL) con una concentración de [0.15M] de precursor, dispersando la cantidad de acetato de

cinc previamente indicada, así como la de surfactante, y se fijó el pH de trabajo (para el presente caso 8.5) agregando gota a gota agua destilada e Hidróxido de Amonio (NH₄OH) (Baker Analyzed) a la mezcla. El sistema se calentó por debajo de los 70°C y mantuvo en agitación permanente, por 6 horas, dejando posteriormente la suspensión envejecer durante 3 días; al finalizar este periodo de tiempo se centrifugó la suspensión, a 5000 rpm por 30 minutos, y después de secar la muestra se calcinó a 450°C en una mufla, por 2 horas.

Cabe mencionar, que las variables que se consideraron para modificar las condiciones de síntesis fueron: concentración del precursor (0.1 M) y volumen del solvente (600 mL); manteniendo una cantidad constante de surfactante. Con base en las variables evaluadas se obtuvieron dos sistemas de nanopartículas que se referenciaron como ZnO-NP 0.15/400 y ZnO-NP 0.1/600 los cuales fueron evaluados sobre los hongos en estudio.

5.2.2 Caracterización de las ZnO-NP.

Una vez obtenidas las muestras, a través del proceso de síntesis descrito anteriormente, se caracterizaron usando, inicialmente, Espectroscopia IR (FT-IR), Microscopia Electrónica de Trasmisión (MET) y Difracción de Rayos X (DRX).

5.2.2.1 Espectroscopia IR (FT-IR)

Para determinar los diferentes grupos funcionales, la muestra a analizar se obtuvo mezclando KBr seco con el sólido sintetizado, en una concentración de

aproximadamente el 10% de éste. El barrido se realizó entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} utilizando para ello el espectrofotómetro (Termo Nicolet IR 200).

5.2.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para determinar el tamaño y morfología de las nanopartículas de ZnO sintetizadas, estas se suspendieron en 1mL de etanol y esta suspensión se colocó en un baño ultrasónico, por una hora. Posteriormente, con una pipeta pasteur, se tomó una pequeña cantidad de ella y se depositó sobre una rejilla de níquel previamente recubierta con una membrana formvar, comúnmente empleada en los estudios de microscopia electrónica de transmisión; la rejilla se observó con el microscopio electrónico de transmisión (Jeol Modelo JEM 1200 EX).

5.2.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

Para determinar las fases cristalinas presentes en las muestras sólidas, se tuvieron en cuenta los patrones de difracción de rayos X de las muestras de interés, en polvo, las cuales se registraron utilizando un difractómetro (BRUKER modelo D8 ADVANCE), usando la radiación $K\alpha$ del Cu ($\lambda = 1.542\text{ \AA}$) en el rango de 10 a 70 en 2θ .

5.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL COMPUESTO DE ZnO-NP EN LA SIEMBRA *IN-VITRO* DE *Phoma sp.* y *E. salmonicolor.*

5.3.1 Preparación del inóculo fúngico y bioensayos en medio de cultivo + ZnO-NP.

Para determinar la inhibición del crecimiento micelial de los hongos en estudio, considerando el efecto de las ZnO-NP se prepararon medios de cultivo sólidos para cada cepa, haciendo uso de la metodología mencionada en el apartado 5.1. Los tratamientos evaluados fueron: 1) Medio de cultivo sin ningún tipo de tratamiento (Testigo); 2) Medio de cultivo + oxiclورو de cobre ($23.41 \text{ mmol.L}^{-1}$) (fungicida); 3) Medio de cultivo + ZnO-NP (12 mmol.L^{-1}); 4) Medio de cultivo + ZnO-NP (9 mmol.L^{-1}); 5) Medio de cultivo + ZnO-NP (6 mmol.L^{-1}) y 6) Medio de cultivo + ZnO-NP (3 mmol.L^{-1}), éstas cantidades de NP se tomaron de la bibliografía [19]. Por otra parte, es importante aclarar que el fungicida oxiclورو de cobre ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) fue tomado como “referente” en el estudio, ya que este se emplea como control preventivo en la enfermedad del mal rosado [7]. De igual manera y para buscar una unificación en la metodología, también fue utilizado este mismo fungicida para evaluarlo sobre la muerte descendente del cafeto.

Los tratamientos fueron incorporados al medio de cultivo y antes de servirse en las cajas de petri, se sometieron a un tratamiento en ultrasonido para garantizar la dispersión de los mismos en el medio de cultivo; posteriormente se vaciaron en las cajas petri, dejando solidificar el medio y finalmente, estos sistemas se incubaron por 3 días, tal como se indicó en el apartado 5.1.

Para obtener homogeneidad y reproducibilidad en la siembra, se utilizó un hongo de 16 días de edad, del cual se obtuvieron muestras empleando un sacabocados de 1.5 cm de diámetro, con el fin de garantizar la existencia de

estructuras de crecimiento. Posteriormente se procedió a inocular el micelio en el centro de cada caja de petri que contenía los tratamientos, tal como se ilustra en la (Figura 4C, D y E). Finalmente el experimento se realizó por triplicado (Figura 4F).

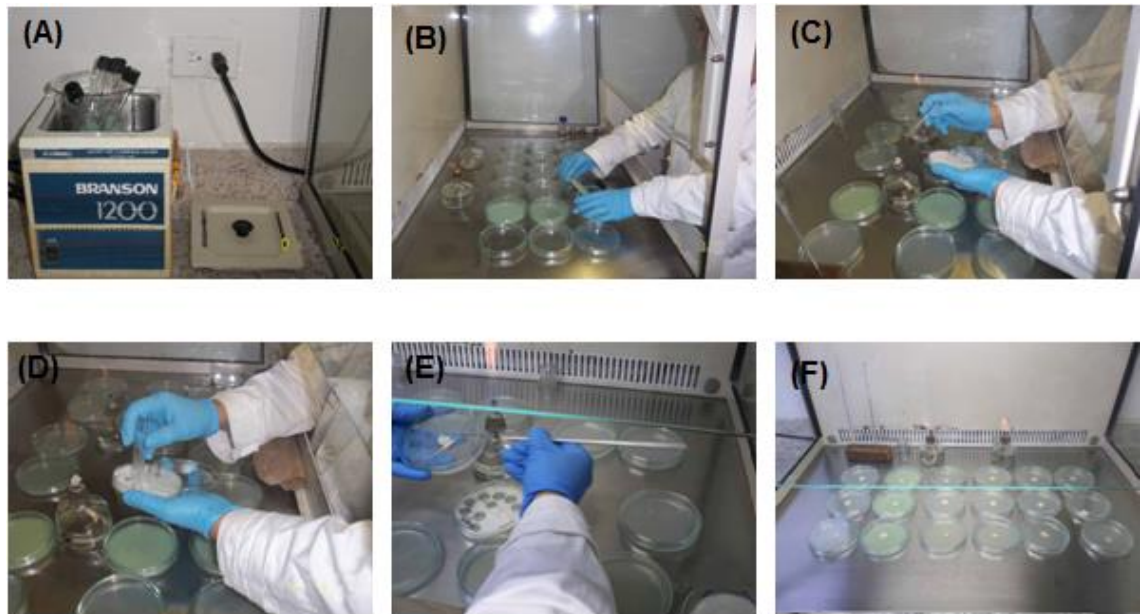


Figura 4. Ilustración de cómo se realizó el ensayo: (A) La dispersión de los tratamientos en los medios de cultivo, empleando ultrasonido, (B) Disposición de los medios de cultivo con los tratamientos en las cajas de petri, (C, D y E) La inoculación del disco de micelio y (F) Disposición del experimento final por triplicado.

Se dejaron pasar 7 días, a partir de la siembra, con el fin de garantizar el crecimiento adecuado de los hongos, de ahí se realizó periódicamente, cada tres días, un registro fotográfico de los cultivos, posteriormente estos registros se llevaron al sistema de análisis de imágenes “Image pro Analyzer” para realizar la medición del área de crecimiento que este ocupó dentro de la caja de petri. Esta actividad se realizó hasta completar un total de 25 días, con el objetivo de observar la acción de los tratamientos en el tiempo.

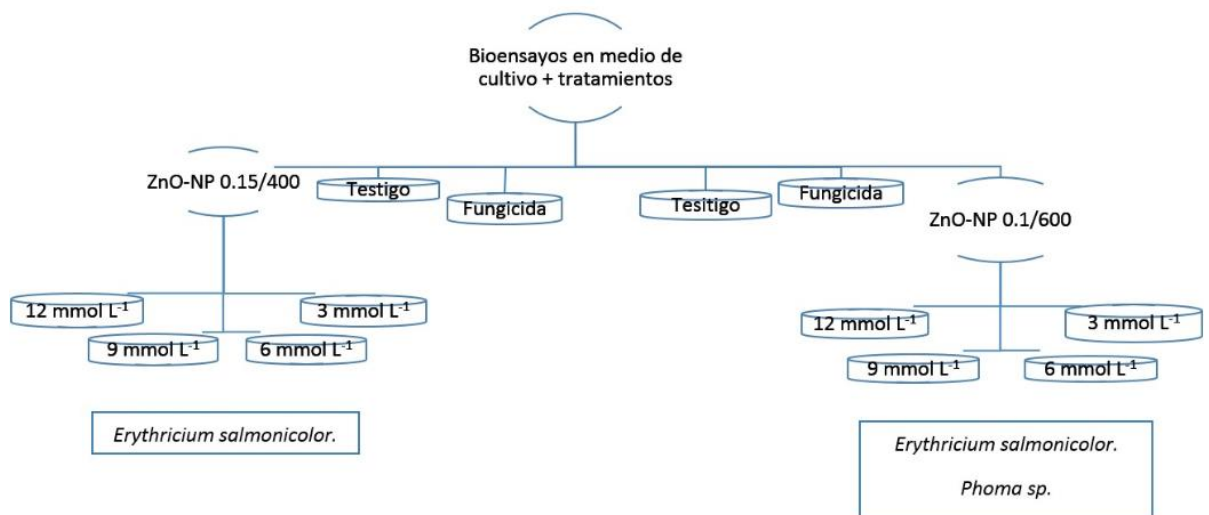


Figura 5: Esquema que representa el diseño de los bioensayos para evaluar el efecto de las ZnO-NP sobre el crecimiento micelial de los hongos *E. salmonicolor* y *Phoma sp.* cada tratamiento se realizó por triplicado.

5.3.2 Porcentaje (%) de inhibición.

La inhibición del crecimiento micelial, se determinó con base en el área de crecimiento (medido en cm²) y se expresó en términos de porcentaje de inhibición, parámetro que se calculó haciendo uso de la siguiente fórmula diseñada por Pandey *et. al*: [63].

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{crecimiento del control} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{crecimiento del control}} \times 100$$

5.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS DAÑOS MORFOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN EL HONGO POR MEDIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (MOAR) Y DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (MET).

5.4.1 Procesamiento y preparación de las muestras.

Las muestras de *Phoma sp.* y *E. salmonicolor* utilizadas, para el análisis ultraestructural del micelio, se procesaron de acuerdo con el protocolo las técnicas estándar para microscopía electrónica de transmisión [64]. En viales eppendorf se colocaron muestras pequeñas de *Phoma sp.* y *E. salmonicolor*, se fijaron durante toda la noche en una mezcla de glutaraldehído al 2.5%, a 4°C. Al día siguiente se retiró el fijador y las muestras se lavaron 3 veces con buffer de fosfato (PBS), durante 5 minutos cada vez. Posteriormente, se postfijaron con tetraóxido de osmio (OSO₄) al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron nuevamente con buffer, 3 veces por 5 minutos, cada vez.

Las muestras postfijadas se deshidrataron con etanol en concentraciones ascendentes de 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, y 100%, con una duración de permanencia de 10 minutos en cada concentración de alcohol. La preimbibición se llevó a cabo con una mezcla de alcohol y resina LR White en proporciones 3:1, 1:1, 1:3, durante 45 minutos las dos primeras proporciones, y la última se dejó por 1 hora.

Finalmente, las muestras se colocaron en capsulas de gelatina, se rotularon y se incluyeron en resina LR White, se polimerizaron en una cámara ultravioleta a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez polimerizadas las muestras, se tomaron las capsulas y se retallaron con una navaja de doble filo para eliminar el exceso de resina y poder obtener, posteriormente, cortes semifinos de 200-300 nm y ultrafinos de 40-60 nm. Los cortes semifinos y ultrafinos se

obtuvieron empleando una cuchilla de vidrio con ayuda del ultramicrotomo (Leica, modelo Ultracut R.).

5.4.2 Microscopia óptica de alta resolución (MOAR)

- **Impronta**

Con cinta transparente se tomaron muestras directamente de los medios de cultivo, considerando todos los tratamientos y sus respectivos controles. Posteriormente, la impronta se colocó sobre un portaobjetos, con una gota de azul de lactofenol y se procedió a observarlas con MOAR (Nikon Microphot). Las imágenes de interés se registraron empleando una cámara (Nikon Digital Sight DS-2Mv) acoplada al microscopio, usando el programa “Nis Elements” para captura de imágenes.

- **Análisis de Cortes Semifinos.**

Los cortes semifinos, de 200-300 nm de espesor, se fijaron con calor en las placas portaobjetos de vidrio, se tiñeron con azul de toluidina, flameando la placa y lavando con agua destilada. Estos cortes se observaron en el microscopio de campo claro (Nikon Microphot), utilizando objetivos de 40x y 100x con el fin de seleccionar el área de mayor interés donde se encontró el mayor número de estructuras hifales dispuestas transversal y longitudinalmente. Esta área fue delimitada y retallada nuevamente para obtener los cortes ultrafinos.

5.4.3 Microscopia electrónica de transmisión (MET)

El análisis y la descripción Ultraestructural del efecto de las ZnO-NP sobre los hongos *Phoma sp.* y *E. salmonicolor*, se realizó observando las micrografías tomadas, a diferentes aumentos, con el Microscopio Electrónico de Transmisión (Jeol Modelo JEM 1200 EX), operado a 80Kv [65].

- **Contraste con Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo.**

Los cortes ultrafinos de 40-60 nm (de color gris a plateados) de grosor se recogieron en rejillas de cobre recubiertas con membranas formvar., se contrastaron con acetato de uranilo al 4%, durante 20 minutos, usando para ello el método de flotación en cámara húmeda y oscuridad; se lavaron goteándoles agua destilada y posteriormente se colocaron en contacto con una gota de citrato de plomo, durante 10 minutos, en una cámara húmeda que contenía lentes de Hidróxido de Sodio (NaOH). Finalmente, los cortes, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel filtro y se observaron en el MET [65].

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Usando los datos de área de crecimiento (medido en cm²) del hongo, parámetro que se registró periódicamente. Para determinar si las diferencias observadas en dicho parámetro eran estadísticamente significativas se realizó un contraste de hipótesis, usando un diseño de bloques completamente al azar,

donde: se compararon cuatro (4) concentraciones de ZnO-NP, (1) concentración de oxiclورو de cobre (fungicida referente) y el testigo, que constituyeron los tratamientos considerados en el estudio (6 en total), y para los siete (7) bloques (días) se consideró la acción de los tratamientos en el tiempo a los 7, 10, 13, 16, 19, 22 y 25 días. Todos los datos se sometieron a un análisis de ajuste a la curva normal. y homogeneidad de varianzas, y como se cumplieron estos dos criterios se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías, realizada en el programa Bioestat 5.3 [66]; los gráficos se construyeron usando el programa GraphPad prism 5 [67].

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CONDICIONES ADECUADAS PARA REPLICAR LAS CEPAS DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *E. salmonicolor* Y *Phoma sp.*

Una vez los hongos fitopatógenos fueron inoculados y se dejaron crecer en su medio de cultivo respectivo, apartado 5.1 se comprobó que a los 16 días el crecimiento fue óptimo por parte de los dos hongos (Figura 6). Estos resultados demuestran que los medios de cultivo previamente referenciados fueron los más adecuados para su crecimiento [61]. Por otra parte, es importante mencionar que el uso de la tiamina en una cantidad de 0.05 g/L estimuló positivamente el crecimiento de *Phoma sp.*, lo cual coincide con lo reportado por Chung y Tzeng [68]. Para el caso de *E. salmonicolor* se encontró que el antibiótico (oxitetraciclina) utilizado en una cantidad 0.03 g/L redujo el riesgo de contaminación y permitió la pureza del cultivo.

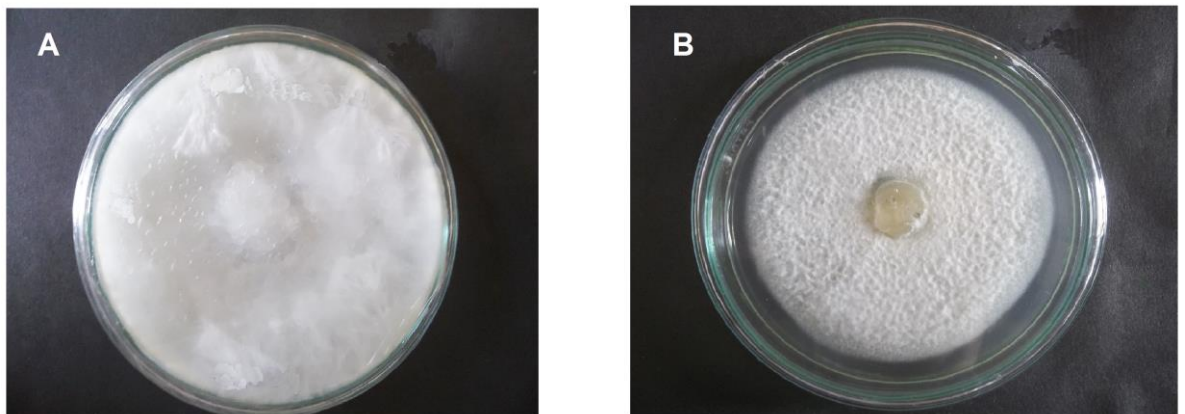


Figura 6. Crecimiento micelial de (A) *E. salmonicolor* y (B) *Phoma sp.* a los 16 días.

El método de conservación que se utilizó en el presente estudio fue la resiembra periódica, técnica que permitió la supervivencia adecuada de los

cultivos en cortos períodos de tiempo. Sin embargo, cabe mencionar que los resultados obtenidos llevaron a tener en cuenta que deben buscarse otros métodos para la conservación de las cepas microbianas, como lo recomiendan Weng *et. al* y Huertas *et. al* [62, 69] donde se garantice la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, ya que si se logra que las propiedades que las hacen importantes permanezcan estables, representaran valiosos resultados dentro de una investigación.

Cabe resaltar, que el método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de tal forma que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de los eventos genéticos. De igual manera debe reducir el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable [62].

6.2 SÍNTESIS QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ZnO-NP

Para la síntesis de ZnO-NP se consideraron las variables mencionadas anteriormente en el apartado 5.2.1: la concentración del precursor y el volumen del solvente. Siguiendo la metodología allí indicada se obtuvieron las nanopartículas que se muestran en la figura 7, usando una concentración de precursor de 0.15 M en un volumen de 400 mL de solvente, este polvo cerámico se referencio como ZnO-NP 0.15/400.

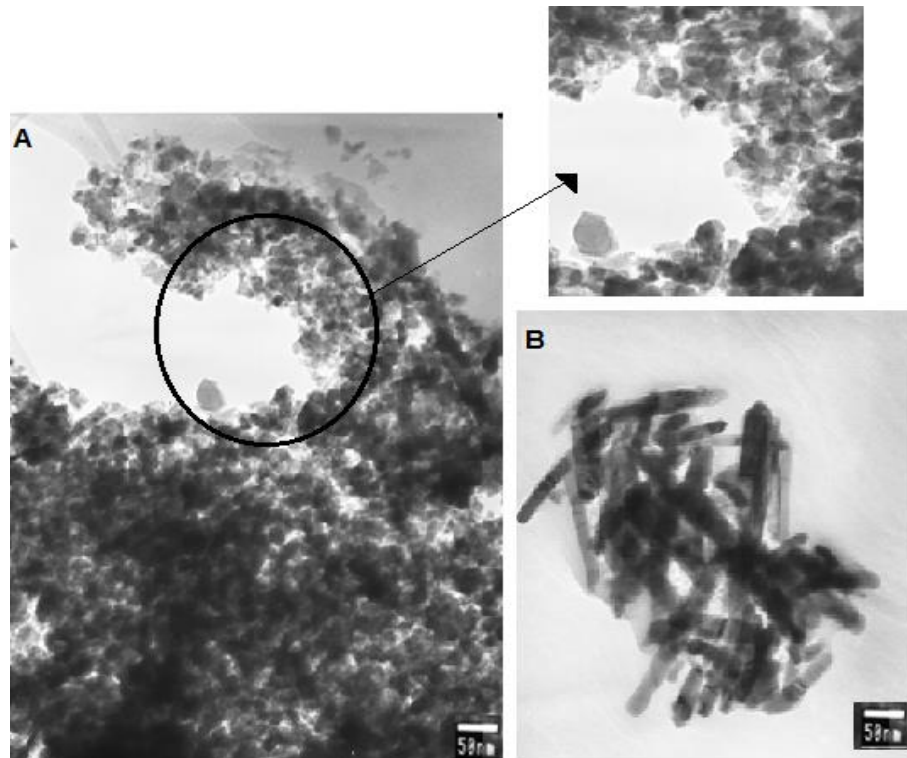


Figura 7. Micrografías de las Nanopartículas ZnO-NP 0.15/400 observadas con MET. El tamaño de estas nanopartículas se encontraba en el rango entre 20 y 35 nm.

Las imágenes de la figura 7 muestran que las NP sintetizadas presentaron dos tipos de morfologías: (A) esferoidal y (B) acicular.

Por otro lado, buscando una mejor dispersión de las nanopartículas, se modificó la concentración de precursor, a 0.1M, y el volumen de solvente de síntesis, a 600 mL; manteniendo la cantidad constante de surfactante utilizado, esta muestra se referencio como ZnO-NP 0.1/600 y su morfología y tamaño se indica en la figura 8.

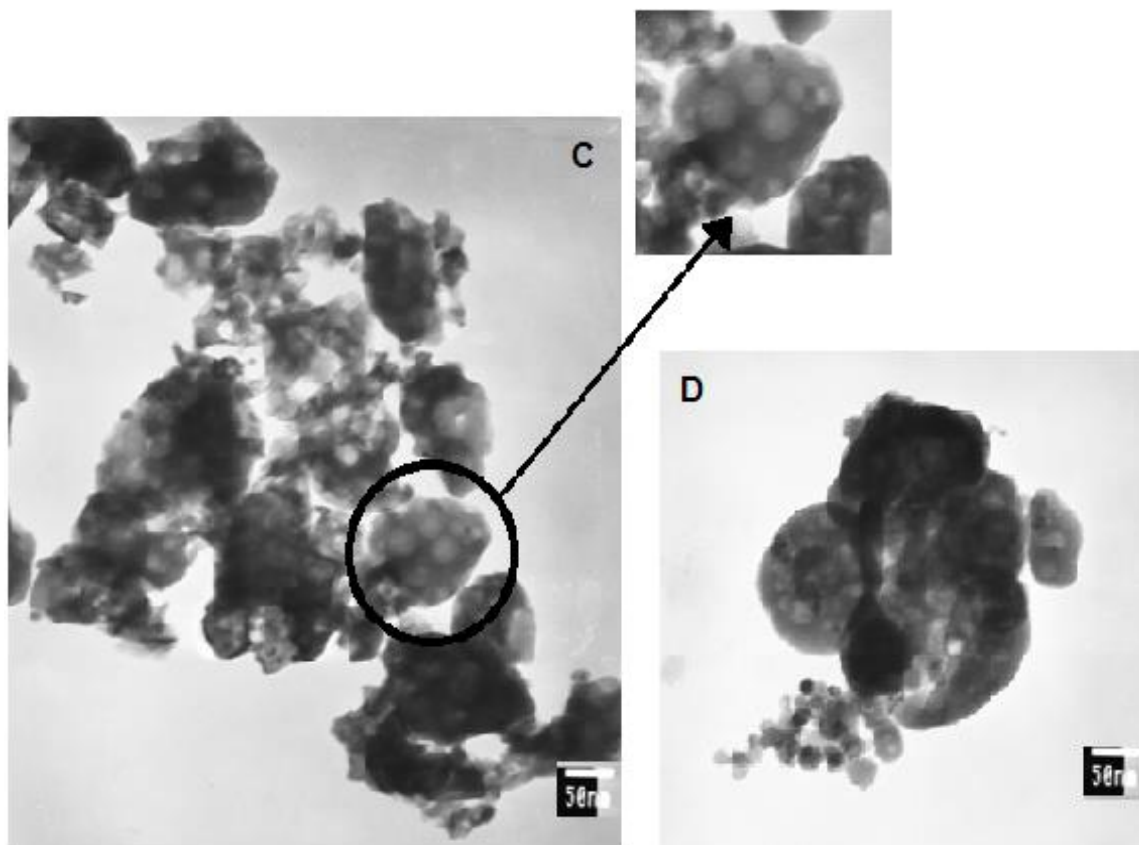


Figura 8. Micrografía de las Nanopartículas de ZnO-NP 0.1/600 observadas con MET. El tamaño de las nanopartículas se encontraba en el rango entre 30 y 45 nm.

Es necesario mencionar que durante la observación de los polvos ZnO-NP 0.1/600 los electrones del haz, utilizados en el MET, propiciaron reacciones que hicieron que las NP se agruparan de una manera especial, tal como se ilustra en la figura 8, generando “clusters” que contenían un número finito de NP.

Al modificar las condiciones de síntesis, los polvos cerámicos obtenidos, presentaron algunas diferencias notables, entre ellas su estado de aglomeración; mientras la muestra de ZnO-NP 0.15/400 presentó aglomerados blandos en las ZnO-NP 0.1/600 se observaron clusters o aglomerados duros (Figuras 7 y 8). Por otro lado, el color de las muestras sintetizadas de ZnO también cambio dependiendo de las condiciones de síntesis (Figura 9):

tonalidad blanca para el ZnO-NP 0.15/400 y un poco más oscura, grisácea, para el ZnO-NP 0.1/600, característica que indica que la estructura de defectos en los sólidos es distinta; ya que el ZnO es un sólido no-estequiométrico, éste puede presentar una variedad de colores entre ellos el blanco, verde pálido, amarillo suave, café, gris y hasta rosado, dependiendo de la concentración de defectos en el sólido, condición definida, en gran parte, por la cantidad de oxígeno presente en su estructura cristalina [70].

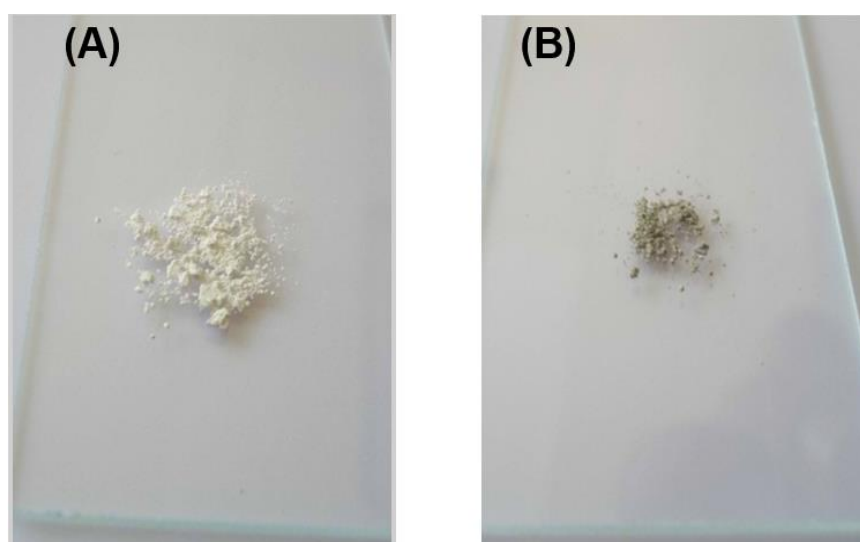


Figura 9. Color de los polvos de las ZnO-NP obtenidas después del tratamiento térmico (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.

6.2.1 Espectroscopia IR (FT-IR).

En la figura 10 se muestra los espectros IR obtenidos para las muestras de interés. En ellas es evidente la presencia de grupos hidroxilo, banda a $\sim 3450 \text{ cm}^{-1}$ y de moléculas de agua, banda de flexión a $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$, así como la ausencia de bandas que se puedan asociar a la presencia de fase orgánica en el sólido, a pesar de haber utilizado compuestos orgánicos en la síntesis de

nanopartículas de ZnO. El tratamiento térmico a 450 °C fue efectivo en la eliminación de la fase orgánica.

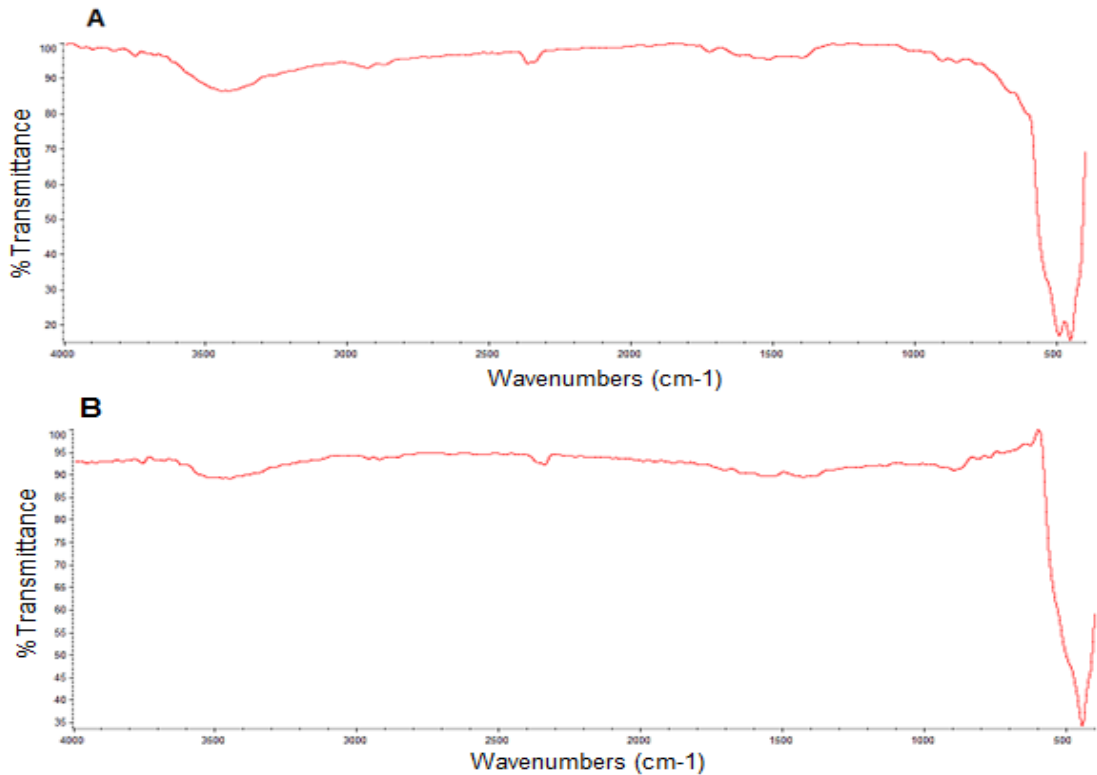


Figura 10. Espectros IR correspondientes correspondientes a las muestras: (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.

Como lo que realmente es de interés para este estudio es la presencia de los enlaces Zn-O y Zn-OH, relacionados con el catión Zn²⁺ y que se encuentra principalmente entre 1000 y 400 cm⁻¹, se tomó esta zona específica del espectro IR para analizar sus diferencias producidas por los cambios en los parámetros de síntesis (Figura 11).

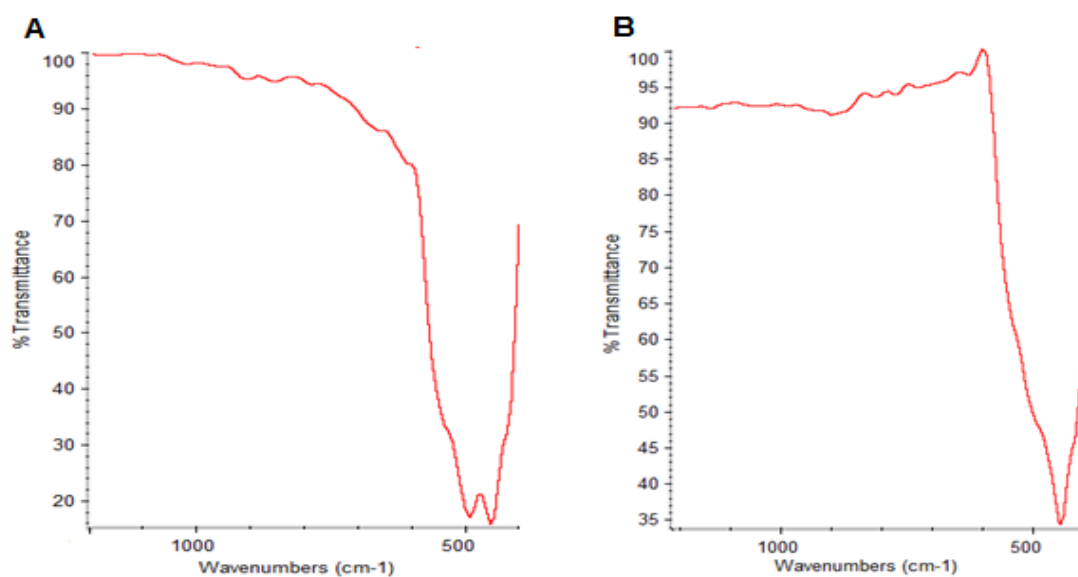


Figura 11. Espectros IR entre 1200 y 400 cm^{-1} correspondientes a las muestras: (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.

Los espectros de la figura 11, entre 1200 y 400 cm^{-1} correspondientes a los dos sólidos de ZnO-NP de interés, presentan evidentes diferencias en el número de bandas y en su ubicación. Mientras que para la muestra ZnO-NP 0.15/400 se observan dos bandas, una a 450 cm^{-1} y otra a 500 cm^{-1} , y un hombro a 560 cm^{-1} para la muestra ZnO-NP 0.1/600 son evidentes una banda a 450 cm^{-1} y un hombro a 500 cm^{-1} . Esta diferencia en los espectros indican que se han presentado cambios en el entorno de los grupos funcionales (Zn – O y Zn – OH, principalmente), en su cantidad y/o en la disposición de los mismos, a nivel interno y superficial del sólido, modificaciones propiciadas por los cambios realizados en los parámetros de síntesis. Esto hace prever, dada la relación estructura – propiedades que presentan los materiales, que las muestras pueden presentar cambios en sus funcionalidades físicas y químicas.

6.2.2 Difracción de rayos X (DRX).

En la figura 12 se observan los difractogramas correspondientes a las dos muestras de interés. Los picos que allí aparecen corresponden al ZnO (PDF 79-206), como única fase cristalina presente, y la esbeltez de los mismos indica una buena cristalización de las muestras. A diferencia de los espectros de IR, figuras 10 y 11, en los difractogramas (Figura 12) no hay ninguna diferencia evidente entre ellos, lo que indica que no hay cambios de rango largo en la estructura de las muestras. Esto lleva a concluir que los cambios observados en las muestras, propiciados por la variación en los parámetros de síntesis, son de tipo más local como lo indica la espectroscopia IR (Figuras 10 y 11).

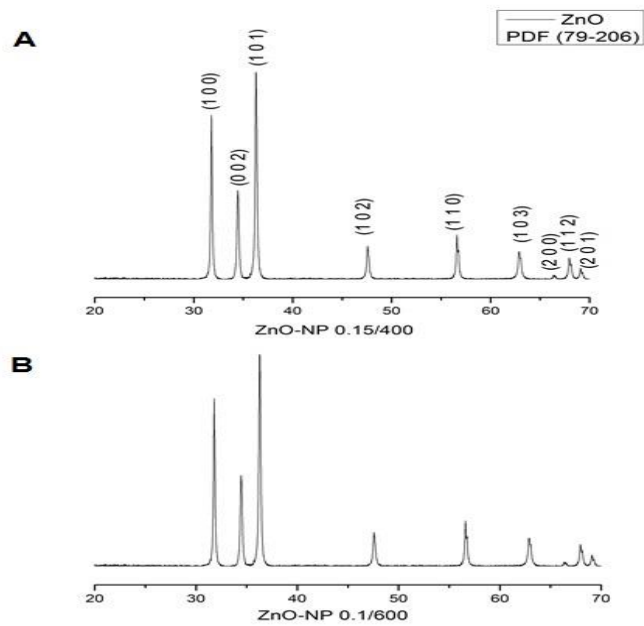


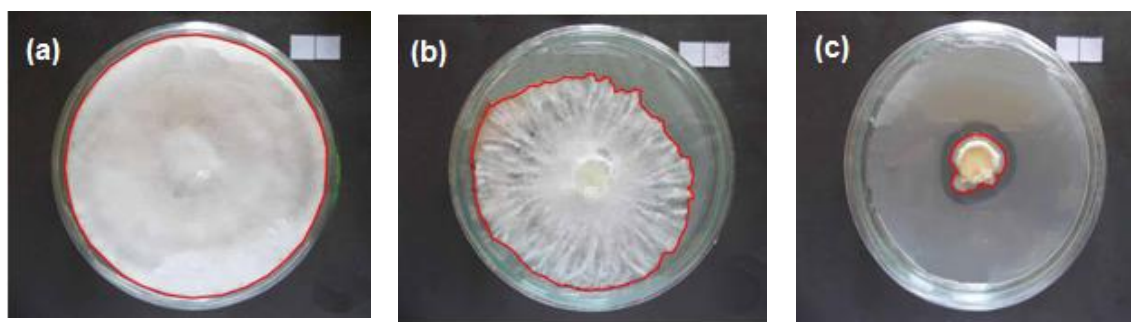
Figura 12. Difractogramas correspondientes a las muestras: (A) ZnO-NP 0.15/400 y (B) ZnO-NP 0.1/600.

6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE ZnO-NP EN EL CULTIVO *IN-VITRO* DE *E. salmonicolor* Y *Phoma sp.*

6.3.1 Crecimiento de *E. salmonicolor* con el sistema de ZnO-NP 0.15 /400

En la tabla 1 se indican las características del crecimiento macroscópico del hongo *E. salmonicolor*, a los 16 días de edad, en el medio de cultivo base papa dextrosa agar + oxitetraciclina, considerando el testigo, el tratamiento con el fungicida y el que contenía una de las concentraciones del tratamiento con ZnO-NP 0.15/400 (9 mmol.L⁻¹). Observando las fotografías es evidente la eficiencia de las ZnO-NP 0.15/400, concentración 9 mmol L⁻¹, sobre la inhibición del crecimiento del hongo. De acuerdo con estos resultados, a los 16 días el tratamiento con el fungicida no logró inhibir o retrasar el crecimiento del hongo, mientras que las ZnO-NP 0.15/400, en la concentración indicada, si lo hicieron. Como resultado de esta primera observación, fueron evidentes cambios morfológicos en: forma, margen, textura, y área de crecimiento del hongo.

Tabla 1. Crecimiento micelial macroscópico del hongo *E. salmonicolor* a los 16 días de edad: (a) Testigo, (b) Tratamiento con el Fungicida y (c) Tratamiento con una concentración 9 mmol.L⁻¹ de nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.15/400.



FORMA		
(a). Circular	(b). Filamentoso	(c). Irregular
MARGEN		
(a). Entero	(b). Filamentoso	(c). Lobular
TEXTURA		
(a). Algodonosa	(b). Afelpada	(c). Glabrosa
AREA DE CRECIMIENTO		
(a). 84.62027 cm²	(b). 54.53724 cm²	(c). 4.04790 cm²

Con el objetivo de determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. salmonicolor* ocasionado por los tratamientos con NP de ZnO-NP 0.15/400, tomando como referencia el testigo y el fungicida, se hizo uso de la metodología y la igualdad indicada en el numeral 5.3.2; los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Las mediciones de las áreas del hongo realizadas en los días de seguimiento asignados, y el cálculo del porcentaje de inhibición haciendo uso de las mismas, revelaron que las ZnO-NP 0.15/400 ocasionaron efectos inhibitorios significativos, sobre el crecimiento de los hongos, si se comparan con el testigo (tabla 2). Observando los resultados de la tabla 2, se hace evidente que el porcentaje de inhibición más alto se presentó el día 10 con un 84.98%, el cual decreció con el tiempo y al final del

experimento, en el día 25, se obtuvo un 64.29% de inhibición. Esto indica que las NP presentaron inicialmente una capacidad antifúngica alta, que con el tiempo disminuyó sin llegar a perder totalmente su acción inhibitoria: su porcentaje más bajo fue de 23.56%, para la concentración de 3 mmol.L⁻¹ en el día 22, contra el 21.98% que se obtuvo con el tratamiento del fungicida en el mismo día. Considerando los valores del porcentaje de inhibición, registrados en la tabla 2, se puede concluir que la presencia de ZnO-NP 0.15/400 en los cultivos afectó el crecimiento del *E. salmonicolor* de manera significativa.

Tabla 2. Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento micelial de *E. salmonicolor* cuando se usaron nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.15/400 en los tratamientos.

PORCENTAJE DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>E. salmonicolor</i> .																
Tratamientos	Concentración mmol.L ⁻¹	Día 7		Día 10		Día 13		Día 16		Día 19		Día 22		Día 25		
		X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	
Testigo	0.0	32.217	0.0	33.009	0.0	34.947	0.0	83.792	0.0	85.459	0.0	88.671	0.0	88.928	0.0	
Fungicida	23.41	8.776	72.76	9.291	71.85	32.793	6.16	57.571	31.29	61.280	28.29	69.174	21.98	77.064	13.34	
ZnO-NP 0.15/400	12	6.818	78.83	6.900	79.09	10.404	70.2	29.137	65.22	31.829	62.75	37.668	57.51	50.170	45.58	
	9	4.990	84.51	4.955	84.98	6.586	81.15	22.881	72.69	29.692	65.25	32.436	63.41	31.753	64.29	
	6	6.619	79.45	9.029	72.64	10.968	68.61	11.756	85.96	35.302	58.68	36.387	58.96	36.602	58.84	
	3	11.97	62.81	12.294	62.75	20.101	42.48	60.298	28.03	60.071	29.70	67.779	23.56	65.288	26.58	

Con base en lo mencionado en el numeral 5.5 y de acuerdo al análisis ANOVA de dos vías, utilizado en este estudio para *E. salmonicolor* se encontraron diferencias significativas sobre el crecimiento del hongo cuando fue sometido a los tratamientos: un Anova de ($F=25.6447$) y un valor de $p<0.0001$. Las mayores diferencias en el crecimiento del hongo se encontraron en los tratamientos de NP en concentraciones de 12, 9 y 6 mmol.L⁻¹; destacándose la concentración de 9 mmol: L⁻¹ como la que ocasiono un mejor control en el crecimiento micelial del hongo, mientras que no hubo diferencia significativa entre el efecto de las ZnO-NP a una concentración de 3 mmol.L⁻¹ y el fungicida.

Por otra parte, se observaron también diferencias significativas entre los bloques (días) encontrando un anova de ($F=30.7202$) y un valor de $p<0.0001$. En la Figura 13 se pueden apreciar todos los resultados de los ensayos realizados, observándose que en los días 10, 19 y 25 la concentración de 9 mmol.L⁻¹ del sistema ZnO-NP 0.15/400 continuo presentado una inhibición significativa sobre el crecimiento micelial del hongo.

Inhibición del crecimiento micelial de *Erythricium salmonicolor*.

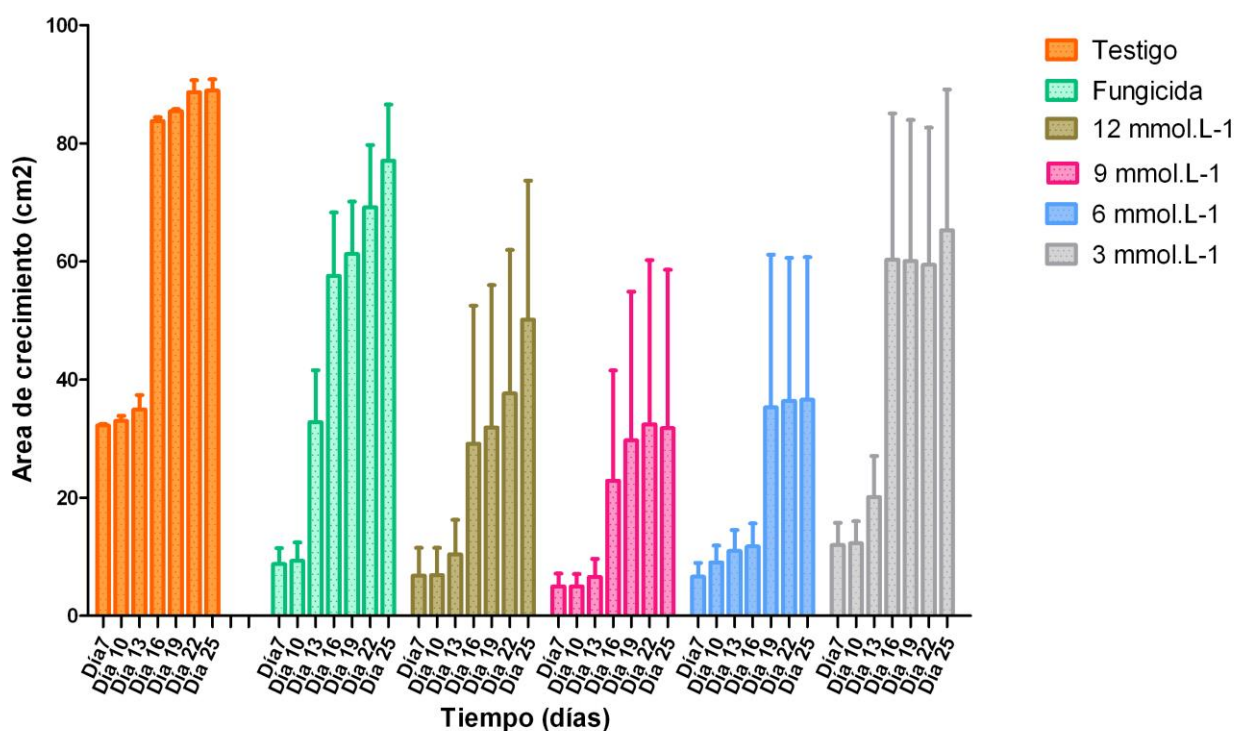


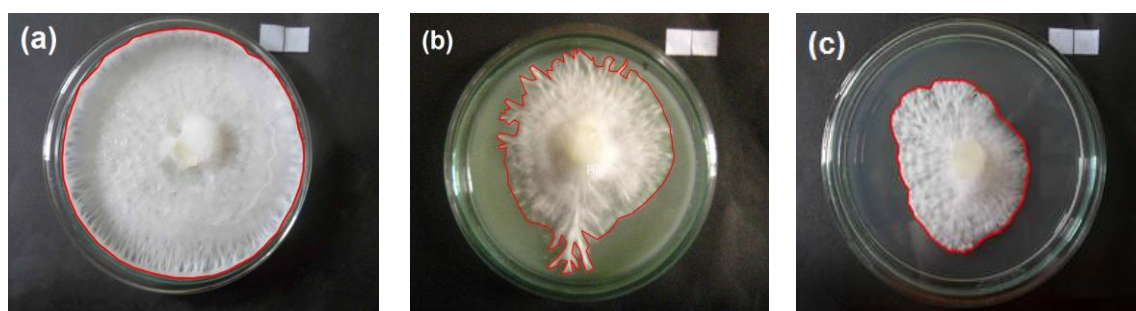
Figura 13. Actividad antifúngica de las ZnO-NP 0.15/400 a diferentes concentraciones sobre *E. salmonicolor*.

6.3.2 Crecimiento de *E. salmonicolor* con el sistema ZnO-NP 0.1/600

Para determinar el efecto de los parámetros de síntesis, sobre la capacidad antifúngica de las ZnO-NP, se realizó un ensayo similar al que se llevó a cabo con muestras de ZnO-NP 0.15/400, descrito anteriormente, pero usando ZnO-NP 0.1/600, óxido que se obtuvo como se indicó en el numeral 6.1; para ello se registró el crecimiento de *E. salmonicolor* y se calculó el porcentaje de inhibición usando estos datos. En la tabla 3 se indican los resultados obtenidos para el tratamiento con una concentración 12 mmol.L⁻¹ de ZnO-NP 0.1/600, para la que fue más evidente el efecto inhibitorio usando estas nuevas

muestras. Los resultados de la tabla 3 revelaron inhibición en el crecimiento del hongo *E. salmonicolor* hasta el día 10, donde es evidente que las NP usadas fueron menos eficientes en el control del crecimiento micelial en comparación con las nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.15/400 (tabla 1). Es importante mencionar, que en este ensayo no fue posible tomar el registro de todos los días propuestos, ya que al día 16 el hongo cubrió la totalidad de la caja de petri. Por lo tanto no se realizó un estudio estadístico debido a que los datos no eran suficientes para obtener un resultado confiable.

Tabla 3. Crecimiento micelial macroscópico del hongo *E. salmonicolor* a los 10 días de edad: (a) Testigo, (b) Tratamiento con el Fungicida y (c) Tratamiento con una concentración 12 mmol.L⁻¹ de nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600.



FORMA		
(a). Circular	(b). Filamentosa	(c). Irregular
MARGEN		
(a). Entero	(b). Filamentosa	(c). Ondulado
TEXTURA		
(a). Algodonosa	(b). Afelpada	(c). Afelpada
AREA DE CRECIMIENTO		
(a). 60.3202 cm²	(b). 35.01736 cm²	(c). 27.96384 cm²

En la tabla 4 se indican los valores obtenidos para el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *E. salmonicolor* en los cultivos tratados con nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600, tomando como referentes el testigo y al tratamiento con el fungicida. Los resultados con este sistema de NP ZnO-0.1/600 (12 mmol.L⁻¹) indican que el mayor porcentaje de inhibición fue del 71.26% en el día 7 contra un 51.07% en el día 10 en comparación con el porcentaje del tratamiento con el fungicida que fue del 66.79% en el día 7 y 46.71% en el día 10. Estos datos indican el efecto de las NP sobre el control del crecimiento micelial de *E. salmonicolor*, sin embargo si se comparan los datos de la tabla 4, porcentaje de inhibición obtenido para el sistema ZnO-NP 0.1/600, y la tabla 2, para el sistema ZnO-NP 0.15/400, se observa una diferencia apreciable entre ellas, siendo más eficiente la inhibición para el segundo sistema.

Tabla 4. Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento micelial de *E. salmonicolor* cuando se utilizaron nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600 en los tratamientos

PORCENTAJE DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Erythricium salmonicolor*.

Tratamientos	Concentración mmol.L ⁻¹	Día 7		Día 10	
		X área de crecimiento (cm ²)	% de inhibición	X área de crecimiento (cm ²)	% de inhibición
Testigo	0.0	52.2374	0.0	65.2233	0.0
Fungicida	23.41	18.3457	66.79	34.7573	46.71
ZnO-NP	12	15.0132	71.26	31.9075	51.07
0.1/600	9	20.4628	58.27	36.1287	44.60
	6	26.7016	48.88	49.8311	23.59
	3	33.2832	36.28	56.0194	14.11


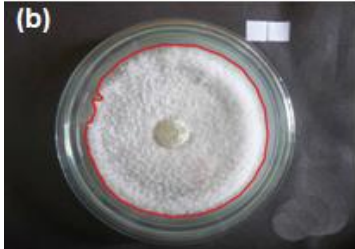

Los resultados no tan favorables obtenidos con la muestra de ZnO-NP 0.1/600 (tabla 3 y 4), en comparación con los de la muestra ZnO-NP 0.15/400, (tabla 1 y 2), puede ser justificado considerando la formación de clusters o aglomerados duros, como se observa en la figura 8, lo que disminuiría la superficie específica del óxido de cinc, propiciando una reducción en su actividad frente al hongo, como se evidencia al observar la tabla 3 donde el hongo llenó casi completamente las cajas de petri a los 10 días de edad. Por otra parte, existe evidencia de que la naturaleza de los dos sistemas de ZnO-NP es diferente, dependiendo de las condiciones de síntesis. Por un lado, en la figura 8 las muestras presentaron diferente color lo que pudo ser ocasionado por la variación en la concentración y la naturaleza de los defectos, condición que debe afectar la funcionalidad de los polvos cerámicos [70]. Además, observando los espectros de IR correspondientes a estas dos muestras, figuras 10 y 11, se presentó diferencia en la ubicación de las bandas, lo que reitera que hubo modificaciones en la estructura de los sólidos a pesar de que química y estructuralmente son similares (Figura 12).

De los resultados que muestran las tablas 1 y 3, se pudo concluir que el efecto del tratamiento y el fungicida fue muy similar, inhibiendo el crecimiento del hongo, con un comportamiento parecido al efecto que tuvo la muestra de ZnO-NP 0.1/600 (tabla 3), pero no tan eficiente como el de la muestra ZnO-NP 0.15/400 (tabla 1) que logró retrasarlo hasta el final del experimento.

6.3.3 Crecimiento de *Phoma sp* con el sistema ZnO-NP 0.1/600

Por otra parte en la tabla 5 se muestra el registro fotográfico del crecimiento macroscópico del hongo *Phoma sp.* a los 16 días de edad, en el medio de cultivo agar extracto de malta + tiamina, considerando el testigo, el tratamiento y el que contenía una de las concentraciones de la muestra ZnO-NP 0.1/600 (12mmol.L^{-1}). Estas fotografías muestran como el tratamiento con el fungicida no logró retrasar el crecimiento del hongo, pues se evidencia claramente que su crecimiento fue muy similar al testigo; mientras que la presencia de las ZnO-NP 0.1/600, concentración 12 mmol.L^{-1} permiten una inhibición evidente, al comparar este sistema con el testigo y el que contiene el tratamiento con el fungicida. Cabe resaltar que la inhibición del crecimiento de *Phoma sp.* fue mayor en comparación con el hongo *E. salmonicolor*, tratado con las NP de la muestra ZnO-NP 0.1/600, concentración 12 mmol.L^{-1} (tabla 3). Esta diferencia en la concentración de las ZnO-NP requeridas para inhibir el crecimiento de los distintos hongos, se puede justificar si se considera la biología, su composición química y sensibilidad de cada hongo ya que pertenecen a grupos taxonómicos diferentes.

Tabla 5. Crecimiento micelial macroscópico del hongo a los 16 días de edad. (a) Testigo, (b) Tratamiento con el Fungicida y (c) Tratamiento con una concentración 12mmol.L^{-1} de nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600.

		
FORMA		
(a). Circular	(b). Circular	(c). Irregular
MARGEN		
(a). Entero	(b). Ondulado	(c). Rizado
TEXTURA		
(a). Algodonosa	(b). Afelpada	(c). Afelpada
AREA DE CRECIMIENTO		
(a). 59.36764 cm^2	(b). 52.36876 cm^2	(c). 24.59042 cm^2

En la tabla 6 se observan los resultados del porcentaje de inhibición para el hongo *Phoma sp.* tratado con el sistema ZnO-NP 0.1/600, donde es evidente que en el día 10 se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición con un 49.02%, el cual decreció con el tiempo y al final del experimento, en el día 25, se presentó un 35.88% de inhibición. Esto indica que las NP presentaron inicialmente una capacidad antifúngica alta, que con el tiempo disminuyó sin llegar a perder totalmente su acción inhibitoria: Su porcentaje más bajo fue de 4.30%, para la concentración de 3 mmol.L^{-1} en el día 19, contra el 7.44% que se obtuvo con el tratamiento del fungicida en el mismo día.

Tabla 6. Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento micelial de *Phoma sp.* cuando se utilizaron nanopartículas del sistema ZnO-NP 0.1/600 en los tratamientos.

		PORCENTAJE DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>Phoma sp.</i>																	
Tratamientos	Concentración mmol.L ⁻¹	Día 7		Día 10		Día 13		Día 16		Día 19		Día 22		Día 25					
		X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición	X área de crecimiento	% Inhibición				
Testigo	0.0	17.073	0.0	26.429	0.0	42.799	0.0	54.700	0.0	56.991	0.0	64.380	0.0	63.278	0.0				
Fungicida	23.41	16.278	4.66	30.978	17.21	44.371	3.67	53.018	3.07	52.753	7.44	54.345	15.59	57.728	8.77				
	12	9.710	43.12	15.793	49.02	25.965	39.33	30.652	42.92	34.042	40.27	39.515	38.62	40.571	35.88				
ZnO-NP 0.1/600	9	11.966	29.92	19.805	25.06	28.971	32.31	35.531	33.83	42.702	25.07	45.373	29.52	45.983	27.33				
	6	14.320	16.13	21.385	19.09	33.889	20.82	37.344	30.46	42.599	25.25	48.185	25.16	47.387	25.11				
	3	15.022	12.01	27.620	4.51	31.071	27.40	50.640	5.70	54.539	4.30	53.273	17.25	53.585	15.32				

En el análisis estadístico realizado para *Phoma sp.* se encontró diferencias significativas sobre el crecimiento del hongo cuando fue sometido a los tratamientos: un Anova de ($F=28.5870$) y un valor de $p<0.0001$. En la figura 14 encontramos que las concentraciones de 9 y 12 mmol.L⁻¹ fueron más activas en la inhibición del crecimiento micelial, destacándose la de 12 mmol.L⁻¹ como la que ocasionó un mejor control en el crecimiento micelial del hongo; mientras que no hubo diferencia significativa para la concentración de 3 mmol.L⁻¹ y el tratamiento con el fungicida

Por otra parte, se hallaron diferencias significativas en los bloques (días) encontrando un Anova de ($F=30.7202$) y un valor de $p<0.0001$. Las mayores diferencias en la inhibición del crecimiento micelial del hongo, se registraron entre los días: 10, 16 y 25 (Figura 14).

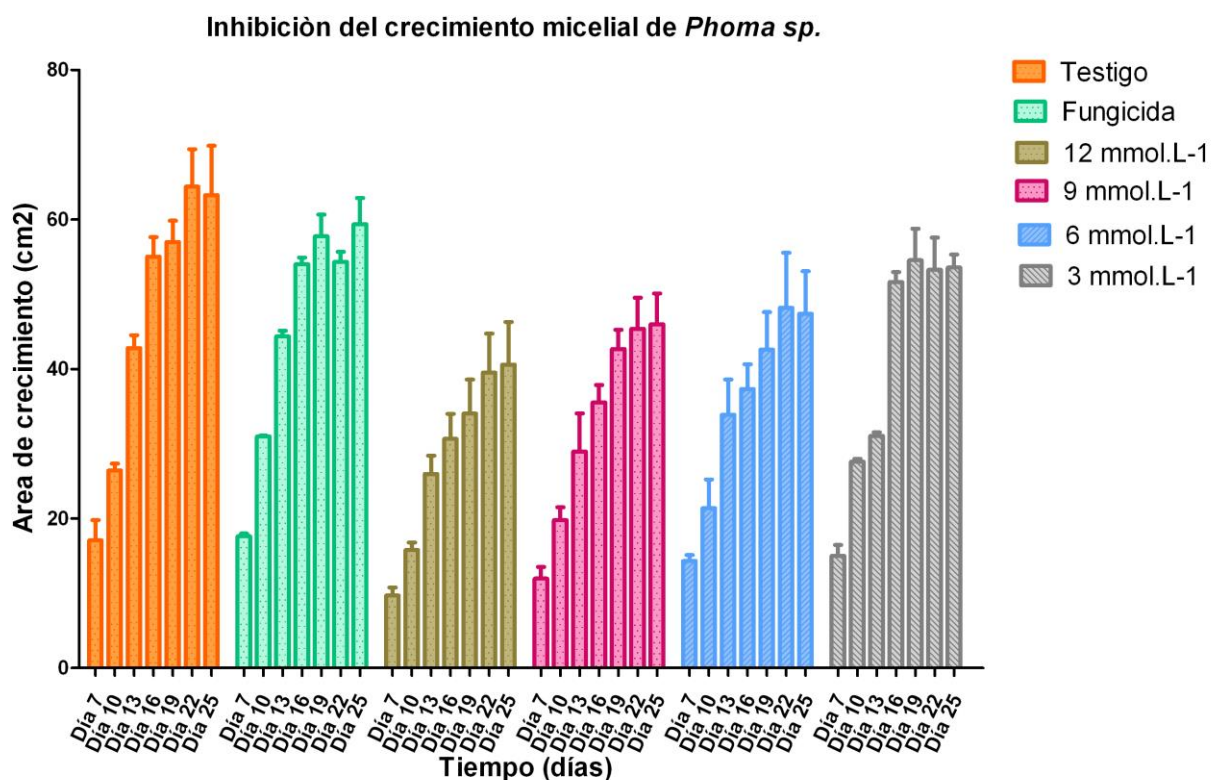


Figura 14. Actividad antifúngica de las ZnO-NP 0.1/600 sobre el crecimiento micelial de *Phoma sp.* considerando diferentes concentraciones de estas nanopartículas.

Comparando con investigaciones previas, se han obtenido resultados inhibitorios al usar ZnO-NP en concentraciones mayores a 3 mmol.L⁻¹ en los hongos: *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum*. Sin embargo se determinó que las ZnO-NP fueron más efectivas contra *P. expansum* que en *B. cinérea* [19]. Los resultados obtenidos por estos investigadores demuestran que el efecto varía dependiendo del organismo con el que se esté trabajando. Los resultados de esta investigación muestran algo similar, ya que, se observó mayor inhibición en *E. salmonicolor* al inocular el medio con NP del sistema ZnO-NP 0.15 /400, pero en el caso de *E. salmonicolor* tratado con el sistema ZnO-NP 0.11/600 la inhibición fue menor comparada con la de *Phoma sp.* evaluado con el mismo sistema de NP.

Por otro lado, el tratamiento con el fungicida no fue significativo, por tanto no mostró una disminución tan marcada en la inhibición del crecimiento de los hongos estudiados. Este resultado, puede justificarse inicialmente, porque las condiciones utilizadas en laboratorio son distintas a las que se manejan en campo, lo que podría estar ocasionando una variación en su modo de acción sobre la inhibición de los hongos estudiados.

De acuerdo a las consideraciones anteriores, se puede concluir que bajo condiciones *in-vitro* en las que llevamos a cabo el experimento, obtuvimos que las ZnO-NP son más efectivas sobre la inhibición del crecimiento micelial de los hongos en comparación con el fungicida. Sin embargo no podríamos atrevernos a decir que el fungicida no es efectivo en el control de estas enfermedades, ya que para ello se deberán realizar más ensayos y no solo con oxiclورو de cobre sino también con otros fungicidas a fin de poder comparar su efecto con el de las ZnO-NP.

6.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS DAÑOS MORFOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN EL HONGO POR MEDIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (MOAR) Y DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (MET).

6.4.1 Cambios morfológicos de *E. salmonicolor* y *Phoma* sp. observados con MOAR.

En la figura 15 y 16 se muestran las imágenes del micelio que se obtuvieron como resultado de la impronta, procedimiento descrito en el apartado 5.4.2. Se observaron hifas con paredes lisas, estructura de “red” y septos bien definidos (Figura 15A), los cuales se tiñeron más en comparación con el interior de la hifa.

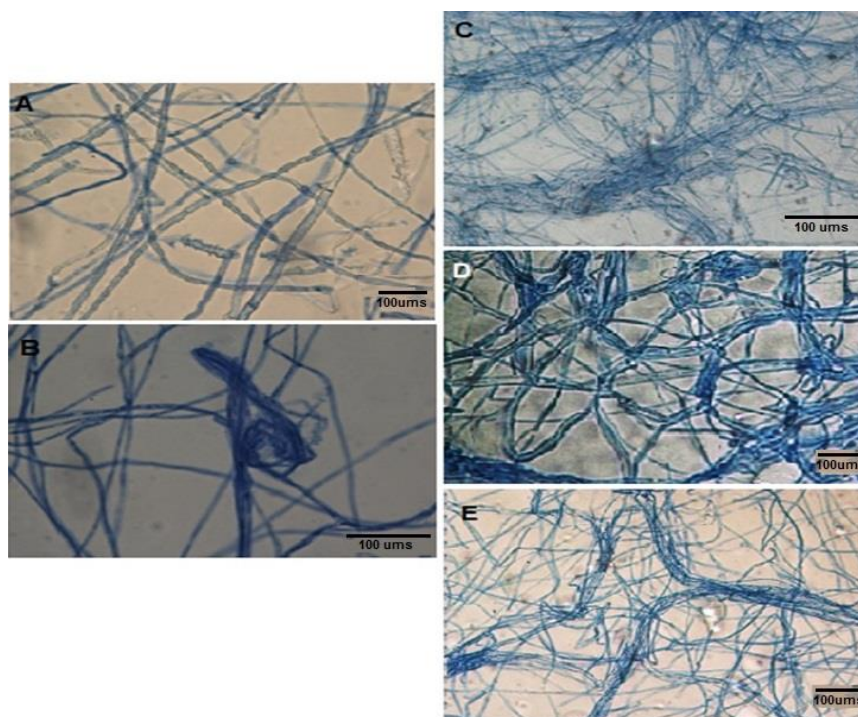


Figura 15. Imagen de las estructuras hifales de *E. salmonicolor*. (A) Testigo, (B) Tratamiento con el Fungicida, (C) Tratamiento 12 mmol L⁻¹, (D) Tratamiento 9 mmol L⁻¹ y (E) Tratamiento 6 mmol.L⁻¹ ZnO-NP 0.15/400.

En la (Figura 15B) se observa que las fibras de las hifas tienden a agruparse y que la tinción utilizada presentó una mayor afinidad hacia el interior, lo que no permite la visibilidad de los septos. En los tratamientos 12, 9 y 6 mmol L⁻¹ con la muestra ZnO-NP 0.15/400 se observó como respuesta una deformación en las estructuras de crecimiento, ya que las fibras de las hifas fueron notablemente más delgadas y tendían a agruparse (Figura 15C, D y E). Por lo observado es evidente que las ZnO-NP 0.15/400 inhibieron el crecimiento de *E. salmonicolor*.

Por otro lado, en las Figuras 16A y 16B se observan las imágenes del testigo y el tratamiento con el fungicida del hongo *Phoma sp.* los cuales presentaron hifas de paredes lisas, con septos no muy visibles y formación de anillos en la parte apical de la hifa; por lo observado, no se evidenció un aparente cambio en las estructuras de crecimiento. Éste resultado indica que el fungicida utilizado no retrasó el crecimiento del hongo, a diferencia del tratamiento con la

muestra de ZnO-NP 0.1/600 (12 mmol.L^{-1}) (Figura 16C), donde se observó el rompimiento de las fibras hifales, condición que revela que sí hubo un efecto ocasionado por la presencia de este óxido.

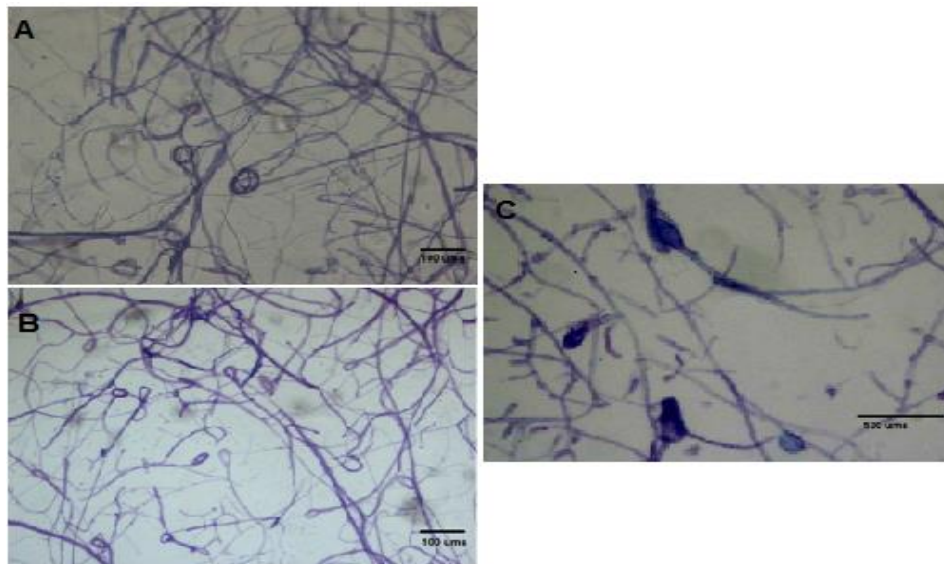


Figura 16. Imagen de las estructuras hifales de *Phoma sp.* (A) Testigo, (B) Tratamiento con el Fungicida y (C) Tratamiento con una concentración 12 mmol.L^{-1} de ZnO-NP 0.1/600.

6.4.2 Cambios Ultraestructurales de *E. salmonicolor* y *Phoma sp* observados con MET.

En los cortes de *E. salmonicolor* a los 16 días de crecimiento, se observó en el testigo la presencia de organelas como vacuolas (V) y mitocondrias (Mit) en un citoplasma (Cit) conservado, con una pared celular definida (Pc), lo que ocasionó que fuera más electrodensito [71] al momento de observarlo en el microscopio electrónico de transmisión (Figura 17 A); mientras que en el tratamiento con el fungicida, se muestra un fraccionamiento de la pared celular, sin embargo no se considera como un cambio relevante, ya que es su

estructura es similar a la del testigo (Figura 17 B). Finalmente en los cortes del hongo tratado con ZnO-NP 0.15/400 (9 mmol.L^{-1}), se evidenció un engrosamiento uniforme de la pared celular, además de una notable licuefacción del contenido citoplasmático haciéndolo menos electrodensos (Figura 17C), al igual que sucedió con la concentración de 12 mmol.L^{-1} que además presentó algunas vacuolas (V) y un desprendimiento de la pared celular (Pc) (Figura 17D).

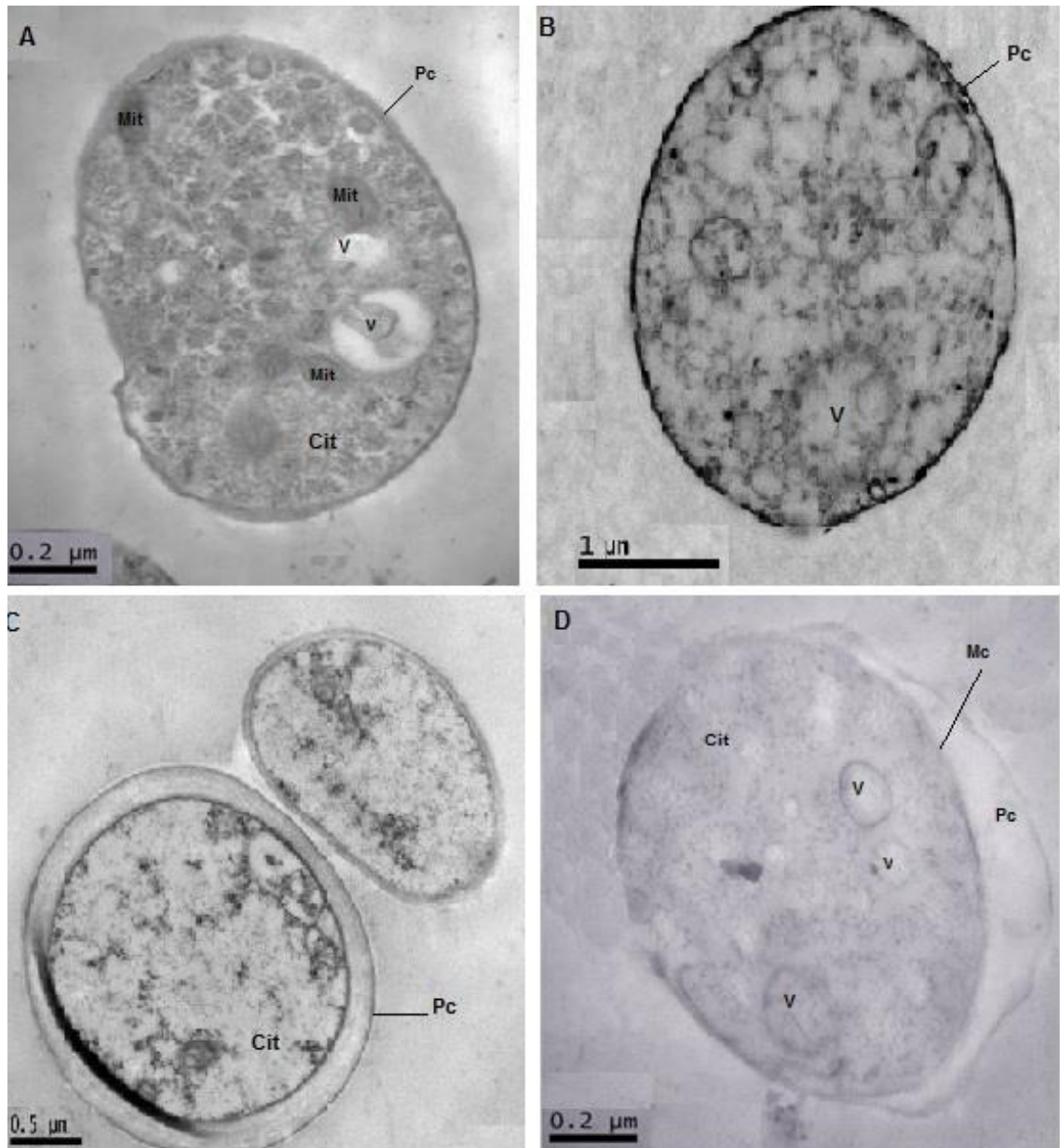


Figura 17. Micrografía electrónica de transmisión de *E. salmonicolor*. (A) Testigo, donde se observan: vacuolas (V), mitocondrias (Mit), pared celular (Pc) y citoplasma (Cit) (B) En el tratamiento con el fungicida, se distingue la presencia de vacuolas, sus demás organelos no son visibles, (C) con el tratamiento de ZnO-NP 0.15/400 (9 mmol.L-1), se observa un engrosamiento de la pared celular (Pc) y (D) Tratamiento con ZnO-NP 0.15/400 (12 mmol.L-1) un desprendimiento de la pared celular.

Por otro lado, los cortes de las hifas del testigo y el tratamiento con el fungicida de *Phoma sp* a los 16 días de crecimiento (Figuras 18A, B y C), mostraron un citoplasma bien conservado, organelos que se identificaron fácilmente como: núcleo (N), nucléolo (Nu), vacuolas (V) y una gruesa pared celular (Pc) rodeada por una red fibrilar compleja (Rf). Esos resultados indican que por parte del tratamiento con el fungicida no hubo una respuesta considerable frente al hongo.

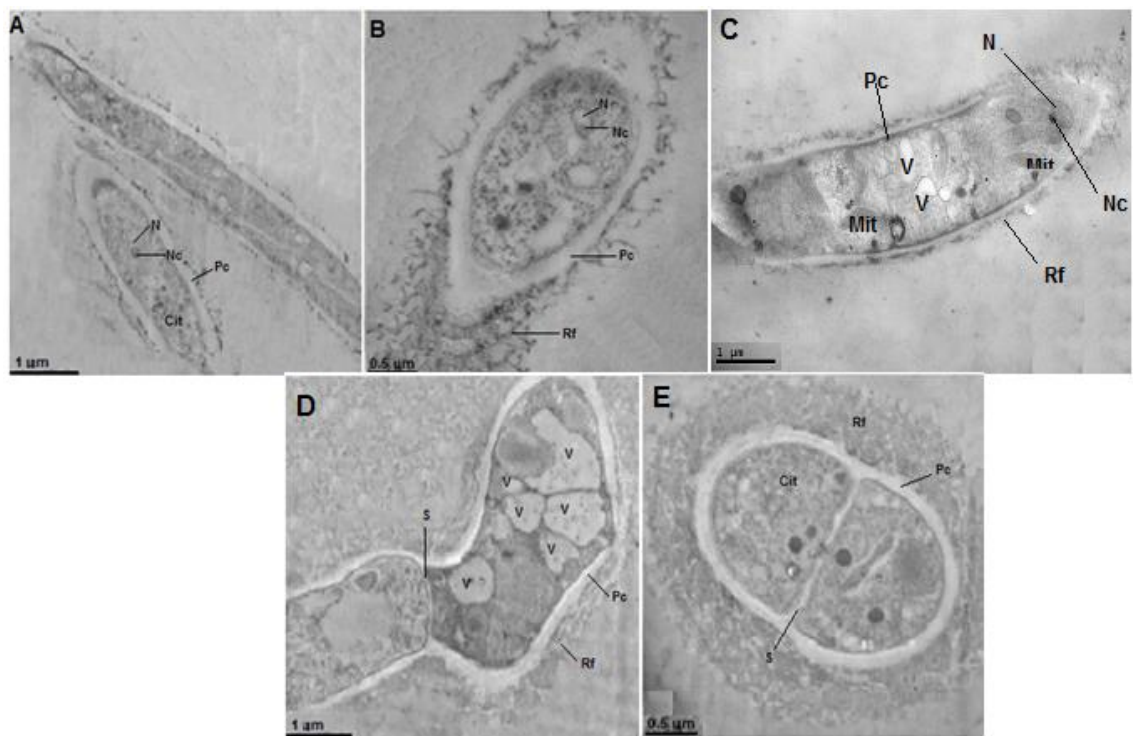


Figura 18. Micrografía electrónica de transmisión de *Phoma sp*. (A y B) Testigo, (C) Tratamiento con el fungicida, donde se observan: núcleo (N), nucléolo (Nu), pared celular (Pc), citoplasma (Cit), vacuolas (V) y mitocondrias (Mit), y (D y E) con el tratamiento de ZnO-NP 0.1/600 (12 mmol.L⁻¹), donde se observan: un incremento en el número de vacuolas (V), y un aumento de la red fibrilar (Rf) alrededor de la pared celular (Pc).

Por otra parte, el tratamiento con ZnO-NP 0.1/600 (12mmol.L⁻¹) ocasionó notables alteraciones en comparación con el tratamiento con el fungicida

(Figura 18C), observándose el crecimiento de la red fibrilar que envolvía la pared celular de la hifa, reacción que pudo generarse como mecanismo de defensa frente a un estímulo que ocasionó estrés en el hongo (Figura 18E); además, el número de vacuolas, al interior de las hifas aumento considerablemente (Figura 18 D).

En resumen, los efectos observados en los sistemas con ZnO-NP, sobre los hongos fitopatógenos estudiados, corresponderían a alteraciones morfológicas considerables en el micelio. Una de las posibles causas de la diferencia en la inhibición del crecimiento de un hongo respecto del otro, podría estar relacionada con la tolerancia innata que cada hongo presenta a la presencia de las ZnO-NP, condición propiciada por la diferencia en su composición química dependiendo del grupo taxonómico al cual pertenecen.

Es importante aclarar, que en base a la revisión bibliográfica realizada hasta el momento, no hay estudios reportados sobre la descripción morfológica y ultraestructural, específicamente sobre los hongos de interés. Por tanto en esta parte no fue posible comparar los resultados obtenidos con los de otros autores.

7. CONCLUSIONES

- Los medios de cultivo base de papa dextrosa agar (PDA) + oxitetraciclina para *E. salmonicolor* y agar extracto de malta + tiamina, para *Phoma sp.* fueron adecuados, ya que se obtuvo un crecimiento óptimo por parte de los dos hongos a los 16 días.
- Se estructuró una metodología que permitió sintetizar Nanopartículas de ZnO de manera controlada y reproducible. Con base en los resultados obtenidos, para garantizar una adecuada funcionalidad antifúngica de las ZnO-NP se requiere controlar de manera rigurosa los parámetros de síntesis, cualquier cambio en ellos puede afectar el comportamiento de las Nanopartículas.
- Las ZnO-NP con tamaños en el rango entre 20 y 45 nm presentaron una capacidad antifúngica significativa sobre el crecimiento micelial *in-vitro* de los hongos *Phoma sp* y *Erythricium salmonicolor*.
- Las ZnO-NP a una concentración superior a 6 mmol L⁻¹ inhiben significativamente el crecimiento de *E. salmonicolor*, mientras que para *Phoma sp.* fue la concentración de 12 mmol.L⁻¹. Esta diferencia en la concentración de las ZnO-NP requeridas para inhibir el crecimiento de los distintos hongos, se puede justificar si se considera la biología, su composición química y sensibilidad de cada hongo ya que pertenecen a grupos taxonómicos diferentes.
- El tratamiento con ZnO-NP 0.15/400 sobre el hongo *E. salmonicolor* evidenció una licuefacción del contenido citoplasmático haciéndolo menos electrodensos y con un notable desprendimiento de la pared celular. Este resultado se debe estudiar con mayor cuidado ya que puede ser

representativo en el momento de considerar el mecanismo de acción de las ZnO-NP sobre los hongos.

- *Phoma sp.* tratado con ZnO-NP 0.1/600 presento notables alteraciones, observándose un aumento en el número y tamaño de vacuolas, y el crecimiento de una red fibrilar que envolvía la pared celular de la hifa, reacción que pudo generarse como mecanismo de defensa frente a un estímulo que ocasionó estrés en el hongo.
- Los resultados parciales logrados en esta investigación son referentes importantes para futuros trabajos, ya que por ser un estudio pionero en esta línea de investigación puede servir como base para otras investigaciones donde se busque mejorar el control de las enfermedades de origen fitopatógeno haciendo uso de la nanotecnología, concretamente de Nanopartículas de óxidos metálicos.

• 8. RECOMENDACIONES

- Ensayar diferentes concentraciones de ZnO-NP, con el fin de estudiar mejor su capacidad antifúngica sobre los hongos fitopatógenos.
- Realizar una resiembra de las cepas, una vez haya finalizado el seguimiento con los tratamientos de ZnO-NP y verificar si son viables para ver si hay daños solo estructurales o si se afectan aspectos metabólicos letales o subletales.
- Se recomienda profundizar en el conocimiento del ciclo biológico e infeccioso de *Phoma sp.* y emplear técnicas moleculares para su clasificación taxonómica.
- Implementar el uso de la técnica de espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) para investigar el mecanismo por el cual las ZnO-NP, afectan el crecimiento de los hongos fitopatógenos.
- Iniciar ensayos para verificar la factibilidad económica y ecológica del empleo de las ZnO-NP frente al uso de fungicidas tradicionales, tomando como referencia los resultados de esta investigación para posteriores estudios.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Parras, P. ; Martinez, T.M. ; M.A.; Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. Food Chemistry. N°102 (3): 582-592. 2007.
2. FNC (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia) Comportamiento de la Industria Cafetera Colombiana 2013. pag. 8-12. 2013
3. Naranjo, M. ; Vélez, L.T. ; Rojano, B.A. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. Revista Cubana de Plantas Medicinales. N° 16 (2): 164-173. 2011.
4. Garcia Romero, J.U. Memorias I curso internacional de riesgos fitosanitarios para la agricultura colombiana 1999.
5. Guzmán, M.P. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Acta Zoológica Mexicana. N° 1: 53-78. 2001.
6. Gil, V.L. y Leguizamon, J.C. La muerte descendente del cafeto/Phoma/spp. Avances Técnicos Cenicafé (Colombia), (278). 2000.
7. Galvis García, C.A., El Mal Rosado Del Cafeto. Programa de Investigación Científica, 2002.
8. Torres, E.J.F. Investigación subgraduada en nanotecnología con aplicaciones en microbiología, biotecnología y ciencias. (Tesis doctoral). Universidad Interamericana de Puerto Rico. 2012.
9. Noguera, J.F. ; Moreno, A. ; Gozalbo, A. ; Ortiz, M.J. Desarrollo de esmaltes cerámicos con propiedades bactericidas y fungicidas. 2010.
10. Kim, K.J. ; Sung, W.S. ; Suh, B.K. ; Moon, S.K. ; Choi, J.S. ; Kim, J.G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. Biometals, N° 22 (2): 235-242. 2009.

11. Cioffi, N. ; Torsi, L. ; Ditaranto, N. ; Tantillo, G. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*. N° 17 (21): 5255-5262. 2005.
12. León, K. ; López, A. ; Gago, J. ; López. Síntesis del óxido de cobre nanoestructurado asistida con irradiación gamma o ultrasonido y sus propiedades antimicrobianas. ECI Perú. 2011.
13. Maneerat, C. ; Hayata, Y. Antifungal activity of TiO photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests. *International journal of food microbiology*. N°107 (2): 99-103. 2006.
14. Lipovsky, A. ; Nitzan, Y. ; Gudanken, A. ; Lubart, R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*. N° 22 (10): 105101. 2011.
15. Lozano, M.M. La Caficultura Colombiana en el Siglo XXI: Una Revisión de la Literatura Reciente. *Revista Gestión y Región*. 2010.
16. Dominguez, J.C. “El Gremio Cafetero Mundial, el OIC, consolidó las cifras reportadas por los diferentes países”. Portafolio.co (Bogotá). 10 de Abr/ 2014 : 3 de Abr de 2013. En: <http://www.portafolio.co/economia/las-exportaciones-café-colombia-crecieron-27>.
17. Cárdenas, L.G. ; Galván, N.I. ; López, N.V. ; González, S.R.F. Inhibición de hongos fitopatógenos de cultivos comerciales por extractos vegetales de plantas popularmente usadas en Guatemala. (Tesis de Pregrado). Universidad de San Carlos, Guatemala. 2012.
18. FNC (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia). Comité Departamental del Cauca - Nuestro Café 2010-2013. En: http://cauca.federaciondecafeteros.org/fnc/nuestro_cafe/category/118.

19. He, L. ; Liu, Y. ; Mustapha, A. ; Lin, M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological research*. N° 166 (3) : 207-215. 2011.
20. Ferrer, J.M. y Vásquez, V.M. *Café especial: Alternativa para la caficultura de risaralda*. 2010
21. Losada, Ó.H.C. and C.F.O. *Yacué, institucional en el desarrollo del sector cafetero colombiano*. 2015.
22. Agrios, G.N., *Plant Pathology*. 2th edition. 1995.
23. Fernandez B,O., *Muerte descendente de los brotes del café causada por especies de Phoma y Colletotrichum*. *Cenicafé* 1961. N°12 (3): 127-140.
24. Cadena Gomez, G. *Estructuras reproductivas de Corticium salmonicolor Berk. y Br. Agente del mal rosado del café*. 1982
25. Alexo Poulos, C.G and Mims, C.W. *Introductory mycology*. 429-445. 1979.
26. Rodríguez, R.A. *Estudio sobre la Enfermedad Rosada del Café*. San José. Ministerio de Agricultura y Ganadería. *Boletín técnico* N°: 46.: 35. 1964.
27. Cadena, G.G. *Mal Rosado. Manual de Sanidad Vegetal*. N°1:1-2.1981.
28. Ramírez Hernández, C. y Cadena Gómez, G. *Estudio biológico de Corticium salmonicolor Berk y Br, agente causal del mal rosado del café*. *Cenicafé (Colombia)*. Abr-Jun. N° 33 (2): 40-52. 1982
29. Ortiz, B.M., *El Mal Rosado del Café (Corticium salmonicolor) Berk. y Br. Consideraciones para el manejo integrado de la enfermedad*. Congreso: Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. 1993..

30. Mejias Sánchez, Y. ; Cabrera, N. ; Toledo, A.M. ; Machado, O.J. La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Revista Cubana de Salud Pública*. N°35 (3). 2009.
31. El Naschie, M.S., Nanotechnology for the developing world. *Chaos, Solitons & Fractals*. N° 30 (4): 769-773. 2006.
32. Montiel, G.C. ; Torres, F.A. ; Gutiérrez, E.J. ; Pardo, E.A. Los Origenes de lo Incierto. *Nuevas Aplicaciones en el Campo de la Nanotecnología*. 2009.
33. Dinham, B. and Malik, S. Pesticides and human rights. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. N°9 (1): 40-52. 2003.
34. Kairyte, K. ; Kadys, A. ; Luksiene, Z. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. N° 128 (0): 78-84. 2013.
35. Kumar, R. ; Sharon, M. ; Choudhary, A.K. Nanotechnology in Agricultural Diseases and Food Safety. *Journal of Phytology*. N° 2(4). 2010.
36. Li, L. ; Deng, J.C. ; Deng, H.R. ; Liu, Z.L. ; Li, X.L., Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. *International journal of food science & technology*. N° 44 (11): 2161-2168. 2009.
37. Henderson, M.A. A surface science perspective on photocatalysis. *Surface Science Reports*. N° 66 (6–7): 185-297. 2011.
38. Wolf, R. ; Matz, H. ; Orion, E. ; Lipozen Cic, J. Sunscreens--the ultimate cosmetic. *Acta dermatovenerologica Croatica: ADC*. N° 11(3): 158. 2003.

39. Gulson, B., *et. al.* Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicological Sciences*. N° 118 (1): 140-149. 2010.
40. Dastjerdi, R. and Montazer, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. N° 79 (1): 5-18. 2010.
41. Wang, Z.L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*. N°16 (25): R829. 2004.
42. Amro, N. ; Kotra, L. ; Wadu-Mesthrige, K. ; Bulychev, S. ; Liu, G. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir*. N°16 (6): 2789-2796. 2000.
43. Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djerdiat, S., Benedetti, M. ; Fiévet, F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*,. N° 6 (4): 866-870. 2006.
44. Adams, L. ; Lyon, D. and Alvarez, P. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*, N° 40 (19): 3527-3532. 2006.
45. Lipovsky, A. ; Nitzan, Y. ; Gedanken, A. ; Lubar, R. EPR study of visible light-induced ROS generation by nanoparticles of ZnO. *The Journal of Physical Chemistry C*. N°113(36): 15997-16001. 2009.
46. Ma, H., Kabengi, N., Bertsch, P., Unrine, J., Glenn, T., Williams, P., Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*: the importance of illumination

- mode and primary particle size. *Environmental Pollution*. N°159 (6): 1473-1480. 2011.
47. Poynton, H.C. ; Lazorchak, J. ; Impellitteri, Ch. ; Smith, M. ; Rogers, M. ; Patra, M. ; Hammer, K. ; Allen, H. ; Vulpe, Ch. Differential gene expression in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. *Environmental science & technology*. N° 45(2): 762-768. 2010.
48. Ma, H., Williams, P., y Diamond, S., Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles—a review. *Environmental Pollution*. N° 172: 76-85. 2013.
49. Reed, R.B. ; Ladner, D. ; Higgins, Ch. ; Westerhoff, P.; Ranville, J. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry*. N° 31 (1): 93-99. 2012.
50. Miao, A.J., Zhang, X., Luo, Z., Chen, Ch., Chin, W., Santschi, P., Quigg., Zinc oxide—engineered nanoparticles: Dissolution and toxicity to marine phytoplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry*. N°29 (12): 2814-2822. 2010.
51. Mingua, Li. ; Suman, P. ; Xue J. ; Madler, L. ; Damoiseaux, R. ; Hoek, E. Stability, bioavailability, and bacterial toxicity of ZnO and iron-doped ZnO nanoparticles in aquatic media. *Environmental science & technology*, N°45 (2): 755-761. 2010.
52. Manzo, S. ; Rocco, A. ; Carotenuto, R. ; Picioni, F. ; Miglietta, M.L. ; Rametta, G. ; Di Francia, G. Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, N° 18 (5): 756-763. 2011.
53. Daohui, Lin. and Baoschan, X. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental science & technology*. N° 42 (15): 5580-5585. 2008.

54. Xia, T. ; Kovochich, M. ; Liong, M. ; Madler, L. ; Gilbert, B. ; Shi, H. ; Yeh, J. ; Zink, J. ; Nel, A. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*. N° 2 (10): 2121-2134. 2008.
55. Sapkota, A. ; Anceno, A.J. ; Baruah, S. ; Shipin, O.V ; Dutta, J. Zinc oxide nanorod mediated visible light photoinactivation of model microbes in water. *Nanotechnology*, N° 22 (21): 215703. 2011.
56. Sawai, J. ; Shoji, S. ; Igarashi, H. ; Hashimoto, A. ; Kokugan, T. ; Shimizu, M. ; Kojima, H. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *Journal of fermentation and bioengineering*. N° 86 (5): 521-522. 1998.
57. Liu, Y. ; He, L. ; Mustapha, A. ; Li, H. ; Hu, Z.Q. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Applied Microbiology*. N° 107 (4): 1193-1201. 2009.
58. Nair, R. ; Varghese, S.H. ; Nair, B.G. ; Maekawa, T. ; Yoshida, Y. ; Kumar, D.S. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*. N° 179 (3): 154-163. 2010..
59. Sharma, D. ; Rajput, J. ; Kaith, B.S. ; Kaur, M. ; Sharma, S. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Thin Solid Films*. N° 519 (3): 1224-1229. 2010.
60. Corrales, E. *et al.*, Actividad Antimicrobial de Nanopartículas de Cobre y Óxido de Zinc contra Hongos y Bacterias Fitopatógenas. (Tesis de Pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2015.
61. Lane, C.R. ; Beales, B.A. and Hughes, K. *Fungal Plant Pathogens: principles and protocols.*: pag 307. 2012.
62. Alemán, Z.W. ; Días, E.R. ; Molina, I. Conservación de microorganismos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. N° 43 (3): pag 1-4. 2005

63. Pandey, D.K. ; Tripathi, N.N. ; Tripathi, R.D. ; Dixit, S.N. ; Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis Suaveolens*. N° 89: pag 344-349. 1982.
64. Bozzola, J.J. and Russell, L.D. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Pag 14-37. 1992.
65. Mosquera Sanchez, L.P., *Caracterización Ultraestructural del Núcleo Interfasico de Selaginella pilifera*. 2011.
66. Ayres, M.J. ; Lima, D. ; De Asis Santos dos Santos , A. ; Lima, L. *Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Instituto Mamirauá, Belém, 2007.
67. Motulsky, H. In *GraphPad Prism 5: Statistics Guide*. GraphPad Software Inc. Press, San Diego CA,; pag: 94. 2007.
68. KuangRen, C. and Tzeng, D. Thiamine (vitamin B1) plays a critical role on sugar utilization by the phytopathogenic fungus, *Ustilago esculenta*. *Research Journal of Microbiology*. No 4(4): pag 178-185. 2009
69. Huertas, S.L. ; Casa, M. M. ; Morales, M.B. ; Moreno, Z.S. ; Cataño, D. *Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN)*. N.4(5). 2006.
70. Greenwood, N.N. and Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements (Second Edition)*. Pag: xix-xx. 1997.
71. Romero, G. *Microscopía electrónica de transmisión (MET) área biomédica: teoría y práctica*. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. Colección Julio Carrizosa Valenzuela. Pag 156. 2003.