

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DEL SUELO



Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata obtenidas mediante extractos de *Larrea tridentata* y su efecto potencial como antagonistas de fitopatógenos y promotor de crecimiento en plantas

Por:

GUILLERMO VARGAS MARTÍNEZ

TESIS:

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y AMBIENTAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Septiembre del 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DEL SUELO

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata obtenidas mediante extractos de *Larrea tridentata* y su efecto potencial como antagonistas de fitopatógenos y promotor de crecimiento en plantas

POR:

GUILLERMO VARGAS MARTINEZ

TESIS:



Que se somete a consideración del h. jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y AMBIENTAL

Aprobada por el comité de asesoría:



M.C. Alejandra Escobar
Asesor principal


Dra. Ileana Vera Reyes
Asesor principal externo
Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar
Co-asesor
Dr. Luis Samaniego Moreno
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila México. Septiembre del 2018.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Con profunda humildad gracias por darme la vida y por protegerme en cada momento a mí y mi familia, por permitirme seguir adelante, porque sin ti no soy nada

A mi Alma Terra Mater

Gracias por abrirme las puertas y darme la oportunidad de estudiar, por ser mi segundo hogar, darme las herramientas para seguir adelante y crecer profesionalmente, vivir una de mis mejores experiencias gracias a mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

A mi familia mis padres, hermanos y abuela por estar siempre conmigo y brindarme su apoyo incondicional y confiar en mí, sin ustedes nada esto hubiera sido posible.

Al **CIQA** por abrirme las puertas para realizar mis prácticas profesionales y realizar este trabajo

A la **Dra. Ileana Vera Reyes** muchas gracias por todo su apoyo incondicional, por depositar su confianza en mí, por enseñarme y darme consejos y conocimientos de forma desinteresada

Al **Dr. Ricardo Hugo Lira** gracias por abrirme las puertas en el CIQA e incluirme en su gran equipo de trabajo y por su confianza así como al proyecto Fronteras de la Ciencia 268 de CONACYT del cual es responsable técnico.

Al **Dr. Alfonso García Cerda** y **Bertha A. Puente Urbina** por permitirme participar el proyecto y apoyo incondicional

Al **Dr. Bulmaro Méndez Argüello** Gracias por su apoyo incondicional, amabilidad y paciencia. A la **Ing. Itandehui Juanita Erendira Esparza Arredondo** por su apoyo, enseñanza y amistad durante este trabajo

A la **M.C. Alejandra Escobar** tiempo y paciencia en la revisión del presente trabajo **Al proyecto interno de CIQA 6385** denominado Biosíntesis y caracterización de nanopartículas obtenidas mediante extractos de *Larrea tridentata* y su efecto potencial como antagonistas de fitopatógenos y promotoras de germinación.

A los investigadores y colaboradores que apoyaron en este trabajo que sin su ayuda no hubiera sido posible

DEDICATORIA

A mi Madre

Elza Martínez Cruz usted es mi fuerza y mi mayor motivación e inspiración para seguir adelante en las adversidades, eres mi ejemplo, gracias por haberme dado la vida e inculcarme en buenos principios, por educarme y estar siempre dispuesta a sacrificarse por el bienestar de sus hijos, te dedico todos mis triunfos, la madre maravillosa que Dios pudo haberme dado estoy orgulloso de ser tu hijo.

A mi Padre

Abelardo Vargas Flores gracias a Dios por estar con nosotros y por ser mi padre, me siento muy feliz de ser tu hijo y contar con tus consejos, el apoyo incondicional que me has brindado, eres parte de mis éxitos.

A mi mujer

Gracias amor por darme una niña tan hermosa, por estar conmigo en las buenas y las malas, darme ánimo y apoyarme incondicionalmente, gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de compartir nuestras vidas y vivir momentos inolvidables Ivonn Meléndez Trejo ¡te amo!

A mi hermana

María Irene gracias por darme tu apoyo incondicional por tus buenos consejos, regaños y estar conmigo sin importar el momento. Te aprecio de corazón por la confianza que has depositado en mí.

A mi hermano

Ángel Abelardo gracias por tu apoyo incondicional y tenerme paciencia

Al profesor

Vicente Martínez Oranday gracias por darme su confianza, compartir sus enseñanzas y consejos, por ofrecerme su apoyo incondicional y por ser un buen mentor

A cada uno de mis amigos por brindarme su amistad, apoyo y motivación en este trayecto de crecimiento profesional y aprendizaje

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	4
GENERAL.....	4
PARTICULARES.....	4
1. REVISIÓN DE LITERATURA	5
1.1 Nanotecnología.....	5
1.2 Aplicaciones de Nanopartículas en la agricultura.....	7
1.3 Nanopartículas como promotores de crecimiento.....	8
1.4 Nanopartículas como agentes antimicrobiales.....	9
1.5. Nanopartículas de plata.....	11
1.5.1 Potencial como antagonista de microorganismos.....	11
1.5.2 Mecanismos de acción antimicrobiana de las NPs de Ag.....	11
1.5.3 Toxicidad de las NPs de Ag.....	14
1.6. Síntesis de nanopartículas metálicas.....	15
1.6.1 Síntesis biológica de nanopartículas a partir de extractos de plantas.....	16
1.7. <i>Larrea tridentata</i>	17
1.7.1 Constituyentes fitoquímicos.....	19
1.7.2 Propiedades antimicrobiales.....	21
1.8. Importancia del tomate en México y características de ciertas enfermedades bacterianas.....	22
1.8.1 Características de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
1.8.2 Características de <i>Alternaria solani</i>	24
1.8.3 Características de <i>Clavibacter Michiganensis</i>	25

2. MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.1 Ubicación del experimento	26
2.2 Material vegetal.....	26
2.3 Preparación de extracto.....	27
2.4 Biosíntesis de las nanopartículas de plata	27
2.5 Caracterización de las nanopartículas	28
2.6. Actividad antifúngica	28
2.6.1 Evaluación de efecto antifúngico de nanopartículas de plata <i>in vitro</i>	29
2.7. Actividad antibacteriana.....	30
2.7.1 Preparación del inóculo de la cepa bacteriana.....	30
2.7.2 Determinación de la concentración celular.....	31
2.8 Evaluación de la aplicación de nanopartículas de Ag en plántulas de <i>S. lycopersicum</i>	32
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1 Preparación y evaluación del extracto de <i>L. tridentata</i> como agente reductor en la biosíntesis de nanopartículas de plata	34
3.2 Caracterización de nanopartículas de plata por difracción de rayos X.....	38
3.3 Análisis de morfología y tamaño de las nanopartículas de plata biosintetizadas por medio de Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	40
3.4 Actividad antifúngica	42
3.5 Actividad antibacteriana.....	45
3.6 Comportamiento fisiológico de las plántulas de tomate	47
4. CONCLUSIÓN	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales constituyentes fitoquímicos de <i>Larrea tridentata</i>	19
Cuadro 2. Nanopartículas de plata a diferentes concentraciones utilizadas <i>in vitro</i> contra hongos fitopatógenos.	30
Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de <i>F. oxysporum</i> y <i>A. solani</i>	43
Cuadro 4. Efecto de la aplicación al follaje de nanopartículas de Ag, en diferentes variables fisiológicas de <i>S. lycopersicum</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala nanométrica (tomada del Blog el faro nanotecnológico, 2018).	6
Figura 2. Esquema de la interacción entre Nanopartículas de plata y células bacterianas (Trepiana, 2015).	13
Figura 3. Follaje de un arbusto de gobernadora (<i>Larrea Tridentata</i>).	18
Figura 4. Cinética de crecimiento de <i>C. michiganensis</i> en medio King's B.	32
Figura 5. Extracto de <i>L. tridentata</i> con nitrato de plata antes (a) y después (b) de la formación de nanopartículas.	35
Figura 6. UV-vis de nanopartículas de plata obtenidas con los diferentes extractos de <i>L. tridentata</i>	36
Figura 7. Bio-reducción de nanopartículas de plata a dos temperaturas.	37
Figura 8. a) Material sólido obtenido del proceso de biosíntesis de nanopartículas de Ag, b) trituración del material sólido.	38
Figura 9. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de plata obtenidas usando el extracto de <i>L. tridentata</i> . En color rojo (plata) y en azul (cloruro de plata).	39
Figura 10. Micrografías TEM de nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de <i>L. tridentata</i> como agente reductor a) morfología, b) diámetro.	40
Figura 11. Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de <i>L. tridentata</i> como agente reductor.	41
Figura 12. Espectro EDX de Nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de <i>L. tridentata</i>	42
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>Clavibacter michiganensis</i> a diferentes concentraciones de Nanopartículas de plata.	45

RESUMEN

La nanotecnología (NT) se define como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño a nivel de nanoescala, o sea, igual o menor que 100 nm (Albanese et al., 2012). Entre las diversas áreas de aplicación de la NT se encuentra el desarrollo de películas para celdas solares, almacenamiento de energía, nano generadores, la catálisis de combustible, y tratamiento de agua (Gehrke *et al.*, 2017), así como reguladores de crecimiento, promotores de germinación y desarrollo de plantas cultivadas (Méndez-Arguello *et al.*, 2016).

El desarrollo de NPs metálicas de plata (NPs de Ag), cobre, óxido de zinc y otras, las cuales tienen un amplio espectro para inhibir el crecimiento de virus, hongos y bacterias fitopatógenas, evidenciando el gran potencial que tienen para producir y formular nuevos e innovadores agentes antimicrobianos comerciales (Yah y Simate *et al.*, 2015). En el contexto de la agricultura moderna sustentable la NT promete aportar soluciones usando nanopartículas (NPs) derivadas de diversos materiales como antimicrobianos (Prasad *et al.*, 2014); las cuales poseen principalmente tres mecanismos de acción: generación de especies reactivas de oxígeno, liberación de iones, y acumulación o penetración de la membrana celular (Alvarado *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se presenta los resultados obtenidos de la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (NPs de Ag) mediante una tecnología amigable con el medioambiente, utilizando como agente reductor extractos acuosos de *Larrea. Tridentata*, con el objetivo de ser utilizadas como agro insumos. Se realizaron ensayos de la efectividad de las NPs de Ag biosintetizadas a diferentes concentraciones (0, 50, 100, 250, 500, 700 ppm); como antagonistas de hongos (*Fusarium oxysporum* y *Alternaria Solani*) y bacterias fitopatógenos (*Clavibacter Michiganensis*), además se presenta un estudio para evaluar el efecto de las NPs de Ag en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Se validó la formación de las NPs de Ag empleando el extracto de *Larrea Tridentata* como agente reductor mediante espectroscopia UV-Visible, difracción de rayos X y microscopia electrónica de transmisión (TEM). Se obtuvieron nanopartículas con una morfología predominantemente esférica con tamaños de diámetro en el intervalo de 5 a 25 nm, y con un tamaño promedio de 9 nm.

Las NPs de Ag aplicadas a una concentración de 700 mg L⁻¹ mostraron efecto antifúngico en *A. solani*, sin embargo, solo inhibió el crecimiento micelial en un 43.32 %. En el caso de *F. oxysporum* la inhibición del crecimiento fue menos efectiva, ya que solo pudo inhibir el crecimiento del hongo en 25.94 %. Por otra parte, se evidencia el poder antibacterial de las NPs de Ag contra *C. michiganensis* debido a que a la concentración más baja utilizada (50 mg L⁻¹), se inhibió completamente el crecimiento de la bacteria. La aplicación foliar de las NPs de Ag en plántulas de *S. lycopersicum* no mostró diferencias significativas en las variables fisiológicas evaluadas con respecto al control. Solo se observó un incremento del índice de clorofila (2%) en el tratamiento a 50 mg L⁻¹.

Estos resultados demuestran que las NPs de Ag tienen potencial para ser utilizadas en la formulación de nuevos agroinsumos para el tratamiento y control de enfermedades fúngicas y bacterianas en la aplicación sustentable en cultivos agrícolas. Sin embargo, esto debe ser corroborados bajo condiciones *in vivo* en plántulas inoculadas con microorganismos para poder ver su efectividad, tanto en condiciones de invernadero y campo abierto antes de hacer las recomendaciones para su uso.

Palabras clave: *Nanopartículas, Metabolitos secundarios, antagonistas, fitopatógenos.*

INTRODUCCIÓN

Los métodos biológicos de síntesis han allanado el camino para la "síntesis verde" o de bajo impacto ambiental para la producción de nanopartículas (NPs), habiendo demostrado ser mejores técnicas de síntesis debido a una cinética más lenta, lo que representa una mejor manipulación y control sobre el crecimiento de las NPs y su estabilización (Ahmed *et al.*, 2016). El uso de extracto de plantas ambientalmente amigables para la síntesis de NPs metálicas ofrecen numerosos beneficios para los ecosistemas y los humanos, ya que no utilizan productos químicos tóxicos como precursores, ni para el protocolo de la biosíntesis (Logeswari *et al.*, 2013).

Por lo general, la síntesis química de NPs conduce a la presencia de algún producto químico tóxico absorbido en la superficie de las mismas, lo que puede tener un efecto adverso en las aplicaciones biológicas o médicas. Debido a eso, la síntesis por química verde representa un gran avance sobre los métodos físicos, ya que es rentable, respetuosa del ambiente, fácilmente se puede escalar para la biosíntesis industrial, además con esta tecnología se pueden generar NPs con tamaño y morfología bien definidas, no habiendo necesidad de utilizar alta presión, energía, temperatura ni productos tóxicos químicos (Mittal *et al.*, 2013).

Diversos estudios reportan que, comparado con otros métodos de síntesis, el uso de extractos obtenidos de plantas enteras y de tejido vegetal, es más simple (Bar *et al.*, 2009; Krishnaraj *et al.*, 2016). Se ha reportado que la velocidad de reducción de iones metálicos usando extractos provenientes de plantas es más rápida en comparación con la biosíntesis empleando microorganismos. Por otro lado, la forma y el tamaño de las NPs sintetizadas mediante extractos vegetales pueden ser controlados y transformados cambiando las condiciones de reacción (Gardea-Torresdey *et al.*, 2003); además los extractos vegetales pueden actuar como agentes

reductores y estabilizantes en la síntesis de NPs. Normalmente la bio-reducción producida por un extracto vegetal se realiza en un extracto acuoso que es mezclado con una solución de la sal del metal. La reacción ocurre a temperatura ambiente y puede completarse en minutos, habiendo diferentes componentes involucrados en este proceso (Ahmed *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, los procesos para la fabricación de NPs usando extractos de plantas pueden ser más económicos en comparación con los métodos relativamente costosos basados en procesos microbianos (Sathishkumar *et al.*, 2009).

La naturaleza del extracto de la planta afecta las características morfológicas de las NPs sintetizadas, debido a que el tipo u origen de los extractos pueden diferir en la concentración de los agentes orgánicos reductores (Mukunthan y Balaji, 2012; Thangavelu *et al.*, 2016). Hasta el momento la biosíntesis de NPs utilizando plantas se ha realizado principalmente con extractos de plantas medicinales como *Aloe vera*, *Centella asiática*, *Catharanthus roseus*, *Capsicum annum*, *Eucalyptus hybrid*, *Moringa oleífera* y *Linum usitatissimum*, entre otras (Ahmed *et al.*, 2016; Anjum y Abbasi, 2016; Malabadi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2007). A diferencia de lo antes señalado, en este proyecto se propone Biosintetizar NPs de plata utilizando como agentes reductores a los metabolitos provenientes de extractos de hojas colectadas del arbusto endémico *Larrea tridentata*.

L. tridentata es un arbusto perenne conocido como gobernadora, chaparral, o hediondilla, el cual se encuentra ampliamente distribuido en las zonas áridas de los desiertos Chihuahuense, Sonorense y Mojave, de México y Estados Unidos, especies similares has sido reportadas en América del sur en Argentina, Chile y Bolivia (Arteaga *et al.*, 2005). Esta planta ha sido utilizada como medicamento de uso tradicional por muchas tribus de norte América, para tratar una amplia variedad de enfermedades (Arteaga *et al.*, 2005). Estudios fitoquímicos de *L. tridentata* revelan un gran contenido de metabolitos secundarios como lignanos, flavoniodes, taninos, triterpenos y naftoquinonas (Hyder *et al.*, 2002), los cuales podrían participar como agentes reductores en la síntesis de NPs. Los extractos obtenidos de hojas de *L.*

tridentata están constituidos principalmente por ácido nordihidroguaiarético (NDGA), kaemferol, quercertina, ácido cinámico, ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido cafeico (Lira-Saldivar *et al.*, 2003). Considerando todo lo antes señalado, en este proyecto se investigó el potencial antimicrobial contra hongos y bacterias fitopatógenas y el efecto de la aplicación de las nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extractos de *L. tridentata* en el crecimiento de plantas de *Solanum lycopersicum*.

HIPÓTESIS

Los extractos de *L. tridentata* serán capaces de actuar como agentes reductores para biosintetizar nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de plata biosintetizadas presentarán antagonismo contra microorganismos fitopatógenos, además la aplicación de estas no tendrán efectos negativos en el crecimiento vegetal.

OBJETIVOS

GENERAL

Biosintetizar nanopartículas de plata utilizando extractos de *L. tridentata* de hojas colectadas de planta de poblaciones nativas, para su potencial aplicación como agroinsumos.

PARTICULARES

1. Colectar hojas de *L. tridentata* colectada durante primavera-verano en Saltillo.
2. Obtener extractos de las plantas colectadas para utilizarlos como agentes reductor de la plata.
3. Caracterizar las nanopartículas obtenidas por UV-Vis, SEM, TEM y difracción de rayos X.
4. Estudiar el potencial antimicrobiano de las nanopartículas biosintetizadas contra *Clavibacter Michiganensis*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*.
5. Analizar las nanopartículas de plata biosintetizadas en el crecimiento de plántulas de *S. lycopersicum*.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Nanotecnología

La humanidad ha desarrollado grandes revoluciones tecnológicas, como la industrial del siglo XVIII y la tecnológica basada en el transistor de estado sólido y los semiconductores del siglo XX, los ejemplos anteriores han demostrado cómo pueden cambiar de manera drástica la vida del ser humano en todos sus aspectos, y han dejado como enseñanza que las transformaciones científicas y tecnológicas requieren de otros paradigmas para educar las nuevas generaciones de estudiantes, científicos, líderes de la academia y de la industria (Mendoza-Uribe y Rodríguez-López, 2007).

Actualmente, se está dando una nueva revolución tecnológica en la investigación de ciencia de materiales nano-estructurados o nanomateriales, es un vasto y activo campo de investigación, tanto en ciencia básica como aplicada, con un alto grado de competencia académica y tecnológica. En términos sencillos, nano es un prefijo griego que significa “enano”, que denota una amplia gama de fenómenos y objetos cuyas dimensiones son de una millonésima parte de un milímetro (1×10^{-9} m) ver escala nanométrica (Figura 1).

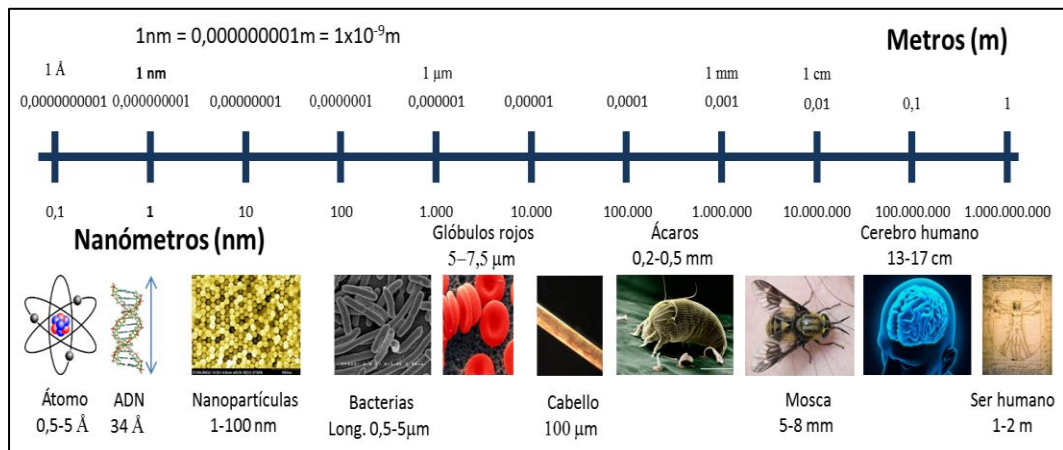


Figura 1. Escala nanométrica (tomada del Blog el faro nanotecnológico, 2018).

La Comisión Europea publicó una recomendación relativa a la definición de nanomaterial, la cual fue definida como: cualquier material producido intencionadamente que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que, el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm (Comisión Europea 2011).

Derivado de la síntesis de los nanomateriales nace una nueva área de la ciencia la Nanotecnología, la cual se ha encargado de diseñar, caracterizar y aplicar estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica (Royal Society 2004). La nanotecnología abarca un amplio rango de herramientas, técnicas y potenciales aplicaciones, algunos científicos encuentran más apropiado llamarlas nanotecnologías, y entre las disciplinas que convergen en ellas se encuentran la química, la física, la biología, la medicina y la ingeniería, entre otras (Mendoza-Urbe *et al.*, 2007).

La nanotecnología es uno de los campos que despierta mayor interés en la investigación mundial del siglo XXI (Mangematin y Walsh, 2012). Gracias a sus

avances se han desarrollado productos a partir de nanomateriales cuyo objetivo es sustituir equipos, materiales y reactivos químicos que puedan resultar costosos o dañinos para el ambiente (Puurunen y Vasara, 2007). Los nanomateriales pueden ser de diferentes tipos, entre ellos nanocristales, nanofibras, nanocables, nanopartículas y nanotubos, cuyas propiedades mecánicas, electrónicas, ópticas, magnéticas y catalíticas, son de gran utilidad útiles en una amplia gama de aplicaciones (Gajewicz *et al.*, 2012).

1.2 Aplicaciones de Nanopartículas en la agricultura

Las aplicaciones de las nanopartículas (NPs) en el sector agroalimentario son a su vez de las más recientes en comparación con su uso en la administración de productos farmacéuticos y médica. La liberación inteligente de nutrientes, la bioseparación de proteínas, el rápido muestreo de contaminantes químicos y biológicos, el envasado inteligente y la nanoencapsulación de nutracéticos son algunos de los temas emergentes de la nanotecnología en la industria agroalimentaria (Sozer y Kokini, 2009).

La nanotecnología brinda grandes oportunidades para la obtención de productos y aplicaciones innovadoras en el sector agroalimentario. Estas aplicaciones se están estudiando, desarrollando e incluso utilizando en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos, desde la agricultura, el procesamiento y embalaje de alimentos, los proveedores/minoristas y por último los consumidores (Berekaa, 2015).

Respecto a la aplicación de la nanotecnología en la producción agrícola destacan: la mejora de la productividad (principalmente en el uso de fertilizantes), optimizando el uso del agua, los productos fitosanitarios y la protección (Fúnez *et al.*, 2016). Sin embargo, en la actualidad solo unos pocos productos están comercializados, y la mayoría de las aplicaciones se encuentran en la etapa de

desarrollo (Perlatti *et al.*, 2012). Una de las principales aplicaciones son los pesticidas, como por ejemplo el uso de nano-encapsulados para liberación de pesticidas y otras sustancias químicas con la ventaja de controlar de manera paulatina su liberación en el medio ambiente y su movimiento (Kahn *et al.*, 2012).

Además, el uso de fertilizantes en forma de nanoemulsiones se utilizan para aumentar la potencia de ingredientes activos o para reducir potencialmente la cantidad de fertilizante que debe ser aplicado (Barati *et al.*, 2010). Otro uso de las NPs en la agricultura son la gestión de residuos agrarios (mediante nanofibras de algodón), el proceso de purificación del agua y la limpieza de suelos (FAO, 2010).

1.3 Nanopartículas como promotores de crecimiento

Las interacciones de NPs con la materia orgánica natural tienen que ser considerados, ya que se ha reportado que las NPs tienen la capacidad de interactuar con las paredes celulares, alterar membranas biológicas, organelos celulares y otras moléculas (Navarro *et al.*, 2008). Se ha demostrado que las NPs metálicas pueden incrementar la eficiencia energética de los centros de reacción en la fotosíntesis, lo anterior se asocia con el incremento en acumulación en biomasa (Gubbins, 2011). Investigaciones recientes han reportado que la aplicación de diversas NPs tiene efectos en germinación, crecimiento, incremento en clorofila, número de hojas, longitud de brotes y raíces. Sin embargo, los efectos de estos nanomateriales van a depender de la etapa del cultivo, así como del tipo y forma y tamaño de las NPs utilizadas (Méndez-Argüello *et al.*, 2016).

Diversos estudios señalan que la aplicación de NPs metálicas como ZnO y Ag incrementan los parámetros de crecimiento de las plantas tales como longitud de los brotes y raíces, superficie de la hoja (área), contenido de clorofila, carbohidratos y proteínas (Pandey *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2012; Salama, H.M., 2012). En cultivos de importancia económica como frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) y maíz (*Zea*

mays L.), han mostrado efectos significativos en la germinación de semillas y en el crecimiento de plantas (Burman *et al.*, 2013).

En resumen, algunos estudios demuestran que el uso de nano fertilizantes causa un aumento en la eficiencia de uso de nutrientes, reduce la toxicidad del suelo, reduce al mínimo los posibles efectos negativos asociados con la dosificación excesiva y reduce la frecuencia de la aplicación. Por lo tanto, la nanotecnología tiene un alto potencial para lograr una agricultura sostenible, especialmente en los países en desarrollo (Naderi y Danesh-Shahraki, 2013). Sin embargo, la información relacionada con el efecto de NPs de Ag es casi inexistente.

Las NPs de Ag poseen un efecto positivo en la germinación de semillas y promotor de crecimiento de plántulas de *Brassica juncea* (Sharma, et al 2012). Por otro lado Savithramma y colaboradores (2012) usaron de NPs de Ag sobre semillas del árbol medicinal *Boswellia ovalifoliolata*, para mejorar la germinación de estas semillas. Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos con NPs de Ag lograron una germinación del 95%, mientras que el testigo solamente obtuvo 70% de germinación. Las semillas de control (agua) llevó más tiempo (10 a 20 días) brotar, mientras que todos los tratados las semillas brotaron en 10 días.

1.4 Nanopartículas como agentes antimicrobiales

El incremento en el uso de plaguicidas convencionales organofosforados, carbamatos y piretroides ha provocado el desarrollo de altos niveles de resistencia a estos plaguicidas por los microorganismos (Cardona *et al.*, 2005). Los fungicidas son esenciales para el manejo de cultivos saludables, permitiendo un adecuado rendimiento con productos de alta calidad. Sin embargo, su efectividad se ha visto seriamente afectada en algunas situaciones por el desarrollo de resistencia del patógeno (Brent y Hollomon, 1998), conduciendo a un mayor consumo de estos químicos con el objetivo de evitar mayores pérdidas.

Esta resistencia aparece generalmente como una respuesta al uso continuo de un mismo plaguicida, y una vez la resistencia aparece, esta es heredada dentro de la población de la plaga o patógeno. (Espinoza y Fabián, 2014). Actualmente, para frenar la resistencia a los plaguicidas se han realizado investigaciones y uno de los avances se dirige hacia el uso de nanopartículas, debido a su uso potencial como agente antimicrobiano para el control de enfermedades en humanos y plantas. Siendo un factor importante su tamaño debido a que entre menor tamaño mayor es su efecto antimicrobial, por lo cual podría ser utilizado para enfrentarnos a diversas enfermedades resistentes a pesticidas comerciales (Yamamoto, 2001; Betancourt *et al.*, 2014). Algunos autores señalan que el uso de insecticidas botánicos asociados a la nanotecnología ofrecen un potencial considerable para aumentar la productividad agrícola, por lo tanto se puede reducir el impacto sobre el medio ambiente y la salud humana (De Oliveira *et al.*, 2014).

Así también algunos investigadores se han enfocado en el estudio antibacteriano y de NPs metálicas debido al potencial para ser utilizados como productos para prevenir y controlar el deterioro por microorganismos fitopatógenos (Palanikumar *et al.*, 2014; Esparza-Rivera *et al.*, 2015;). Varios autores señalan el poder antimicrobial de las nanopartículas de CuO, Fe₂O₃ y ZnO al dañar la pared celular del microorganismo (Ren *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009; Azam *et al.*, 2012). Las nanopartículas metálicas, especialmente aquellas denominadas como “nobles”, de metales como las de oro y plata, se usan como agentes bactericidas debido a su gran relación de área superficial/volumen (Torres, 2002). Por lo que tienen diversas aplicaciones en muchos campos de la ciencia y la tecnología, así como su posible aplicación en la agricultura.

1.5. Nanopartículas de plata

1.5.1 Potencial como antagonista de microorganismos

La plata, por ser un metal precioso, ha sido empleada desde la antigüedad como en joyería, utensilios, monedas, así como para fines sanitarios y médicos. Las sales metálicas se han utilizado para distintas aplicaciones como desinfección de agua, textiles y cosméticos (Monge, 2009).

El aumento en investigaciones de las NPs de Ag se debe a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica (Ávalos *et al.*, 2013). La característica principal de toda nanopartícula, es su elevada área superficial en relación al volumen comparado con el mismo material en estado volumétrico, además de las excelentes propiedades ópticas, catalíticas, electrónicas, su potente actividad antibacterial, antifúngica y antiviral (Hurtado, 2014). La alta capacidad antimicrobiana por la gran área superficial que presentan y otras propiedades como la forma y el tamaño (Lara *et al.*, 2011).

Las NPs de Ag pueden aplicarse, en soluciones coloidales o recubrimientos poliméricos sólidos, esta versatilidad también ha causado la expansión comercial de este tipo de nanopartículas, así como el desarrollo de nuevos métodos de obtención (Tran, Q. *et al.*, 2013).

1.5.2 Mecanismos de acción antimicrobiana de las NPs de Ag

De acuerdo a diversas investigaciones el efecto bactericida de las NPs de Ag es debido a que se pueden penetrar a la membrana celular bacteriana, interactuando con las proteínas sulfuradas y con los compuestos fosforados como el ADN por la facilidad de formar puentes disulfuro. Una vez que las nanopartículas entran a la célula bacteriana, afectan la cadena respiratoria causando la inhibición de la división celular, y por ende, la muerte de la misma (Rai *et al.*, 2009).

Los mecanismos de acción antibacteriana que presentan las NPs metálicas no están bien definidos, se han propuesto tres mecanismos hipotéticos que son los más aceptados y reportados en la literatura.

- 1) Acumulación y disolución de nanopartículas metálicas en la membrana plasmática generan un cambio en su permeabilidad, con la consecuente liberación de lipopolisacáridos, proteínas de membrana y biomoléculas intracelulares (Khan *et al.*, 2012).
- 2) Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) generando daños oxidativos a las estructuras celulares como el DNA, la membrana plasmática y las proteínas de membrana (Fang *et al.*, 2007).
- 3) Adsorción de iones metálicos derivados de las nanopartículas o las mismas nanopartículas en el interior de las células, seguido por el agotamiento de la producción de ATP intracelular y la interrupción de la replicación del ADN (Lok *et al.*, 2006).

Las NPs de Ag pueden liberar iones de plata y generar EROs; estas interactúan con proteínas de membrana; afectando su permeabilidad; y entrar en la célula, y afectar el DNA (Neal A, 2008). En la Figura 2 se puede apreciar las interacciones entre las NPs de Ag y los iones de plata con una célula bacteriana.

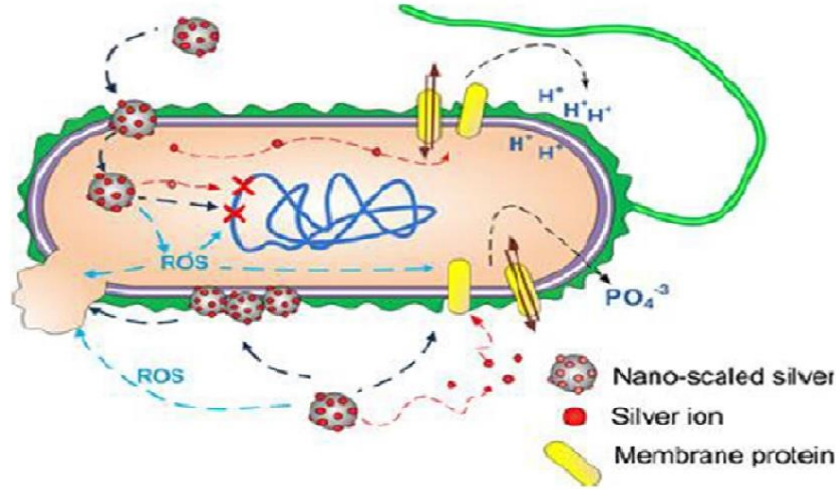


Figura 2. Esquema de la interacción entre Nanopartículas de plata y células bacterianas (Trepiana, 2015).

Además, las NPs de Ag tienen efecto antagonista sobre hongos, estudios previos reportaron que tienen actividad contra fitopatógenos como *Bipolaris sorokiniana* y *Magnaporthe grisea* actuando sobre la formación de esporas y disminuyendo el desarrollo de la enfermedad (Young-Ki y Byung, 2009). Por otro lado, (Lara *et al.*, 2011) reportaron que las NPs de Ag son capaces de inhibir la multiplicación de viral y de impedir su mutación, causando así una menor resistencia al agente antiviral. El mecanismo propuesto para de las NPs de Ag como antivirales es que son capaces de interactuar con proteínas de la cápside viral (Domenech Gordillo, 2017).

El uso de nanopartículas como agentes antimicrobianos ha sido ensayado en diferentes microorganismos, y no cabe duda que estas nanoestructuras sean un gran avance para el tratamiento de enfermedades y la prevención de las mismas (Gulrajani *et al.*, 2008). La ventaja de usar NPs de Ag es que no afecta la fertilidad del suelo en comparación con los agentes anti-fúngicos tradicionales (Ruparelia *et al.*, 2008). Las NPs metálicas, como son las NPs de Ag surgen como un prometedor agente antimicrobiano que podría ser utilizado para enfrentarnos a enfermedades

causadas por hongos y bacterianas como lo son *Fusarium oxysporum* y *Clavibacter Michiganensis*, las cuales actualmente afectan el campo mexicano causando grandes pérdidas, debido a su resistencia a productos agroquímicos convencionales.

1.5.3 Toxicidad de las NPs de Ag

Aunque las NPs de Ag muestran actividad antimicrobiana considerable, la exposición en seres humanos a las nanopartículas es cada vez más alta. Si bien las nanopartículas de plata presentan una gran variedad de beneficios en distintos campos de la ciencia, es necesario evaluar su impacto. Algunos estudios han encontrado que las NPs de Ag pueden causar daños en los pulmones, los riñones, el cerebro y especialmente el hígado, donde se acumulan (Ávalos *et al.*, 2013). También existen reportes adversos de estas estructuras sobre el ser humano y otros seres vivos así como al medio ambiente por su capacidad de liberar iones plata en fase acuosa. La plata es un ácido débil y su tendencia es a reaccionar con bases. La mayoría de las células contienen azufre y fósforo que son bases débiles. El ácido desoxirribonucleico o ADN contiene estos átomos por lo que estas nanopartículas pueden reaccionar con ellos, ocasionar su destrucción y, por lo tanto, llevar a la muerte celular (Castrillón-Rivera y Palma-Ramos, 2014).

El exceso a la exposición de las nanopartículas de plata puede producir daños a la salud; sin embargo, no se ha llegado a un consenso para establecer un límite máximo permisible en productos que contengan estas nanoestructuras (Domenech Gordillo, 2017).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha publicado una guía para la evaluación de riesgos de las aplicaciones de nanomateriales artificiales en alimentos y piensos (EFSA Scientific Committee, 2011). Es el primer documento que da una orientación práctica para hacer frente a los riesgos potenciales derivados de las aplicaciones de las nanociencia y las nanotecnologías a la cadena alimentaria humana y animal. La guía cubre las evaluaciones de riesgo para las aplicaciones en alimentos y piensos, incluidos los aditivos, enzimas, aromas, materiales en contacto

con alimentos, nuevos alimentos, aditivos para piensos y plaguicidas (García, 2016). Así, se evidencia que la regulación del uso de nanomateriales es un largo proceso debido a su diversidad y falta de protocolos establecidos (Harteman *et al.*, 2015).

1.6. Síntesis de nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas tanto por métodos **bottom up** que consisten en partir de átomos o moléculas ensamblar nanoestructuras, las cuales son de menor tamaño que aquellas obtenidas por métodos *top down*; las dimensiones varían frecuentemente entre 2 y 10 nm, el tamaño dependerá del control estricto de las condiciones involucradas en el proceso (Domenech Gordillo, 2017); y por **top down** que inician con uno o varios materiales en escalas micrométricas o mayores, los cuales son sometidos a procesos, comúnmente fisicoquímicos, que disminuyen el tamaño del material hasta obtener estructuras nanométricas (Ahmed *et al.*, 2016). El método que se ha elegido proporcionara las características a las nanoestructuras.

Los métodos de síntesis de nanopartículas se dividen en físicos, químicos y biológicos. Mientras que los métodos físicos tienen la ventaja de ser capaces de producir grandes cantidades de NPs, a su vez, tienen la desventaja de no tener suficiente control sobre el tamaño de la partícula, produciendo NPs con un amplio rango de tamaño que pueden originar un efecto poco controlable y predecible cuando es administrado en un sistema biológico (Gómez, 2013). Dentro de los métodos químicos, el más conocido es la reducción a partir de una sal. Por ejemplo, en la síntesis de NPs de Ag en disolución coloidal requiere de tres componentes: el precursor metálico, el agente reductor y el agente estabilizante. Los precursores más comunes son sales de plata como nitrato, acetato o complejos organometálicos de diamino-plata (Oldenburg, 2016).

Si bien el método de reducción química es muy común y efectivo para la obtención de nanopartículas de plata, son necesarios reactivos tóxicos, como el borohidruro de sodio, el cual se utiliza como agente reductor (Mubayi *et al.*, 2012). Actualmente, la tendencia en los métodos de síntesis, se enfoca en el uso de compuestos que no causan daño al medio ambiente (Gómez, 2013). Es por esta razón, que se han reemplazado los productos químicos por extractos de origen natural los cuales pueden actuar como agentes reductores, de esta manera no solo se reduce la contaminación ambiental, sino que se disminuye el costo de síntesis y además resulta conveniente la escala industrial (Ahmed *et al* 2016); a este método de síntesis de NPs se le denomina "biológica".

1.6.1 Síntesis biológica de nanopartículas a partir de extractos de plantas

En el método de síntesis biológica para la reducción del nitrato de plata se puede emplear material vegetal, levaduras, hongos o bacterias. Una de las ventajas es de utilizar usar extractos de plantas es que no se requieren ambientes estériles, no existe riesgo biológico ni tampoco es necesario extraer o purificar las nanopartículas al final del proceso (Mubayi *et al.*, 2012). Con los extractos de plantas se proporciona además, un medio estabilizante no sólo por el contenido orgánico responsable de la reducción, sino por su composición química ya que contienen enzimas, proteínas, vitaminas, aminoácidos, etc., que pueden actuar como estabilizantes (Iravani, 2011). Los compuestos químicos pueden también funcionalizar las nanopartículas, es decir recubrir la superficie con distintos átomos, moléculas o iones para mejorar sus propiedades o cambiar sus funciones (Ahmed, *et al.*, 2016). Estos compuestos potencializan las propiedades de las nanopartículas ya que, muchos de los extractos naturales se utilizan con fines medicinales, reforzando así la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas (Iravani, 2011).

Otro aspecto importante de la síntesis con extractos naturales es el uso de solventes; la mayor parte de agentes estabilizantes requieren de sustancias orgánicas para su disolución, mientras que las sustancias reductoras presentes en las plantas pueden ser extraídas en medio acuosas, contribuyendo así con la química verde (Zanella, 2012). Ahmed y colaboradores (2016) mencionan que alrededor de cuarenta plantas de todo el mundo se han empleado como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas de plata.

Debido a la diversidad ecológica de México, se podría emplear un gran número de plantas nativas con este mismo propósito. En este trabajo se utilizó a *Larrea tridentata* por su abundancia en desierto chihuahuense y su poca explotación comercial. Estudios fitoquímicos de *L. tridentata* revelan un gran contenido de metabolitos secundarios como lignanos, flavonoides, taninos, triterpenos y naftoquinonas (Hyder *et al.*, 2002), los cuales podrían participar como agentes reductores en la síntesis de NPs. De acuerdo a la revisión bibliográfica, no se han realizado experimentos de síntesis con esta planta, la producción de NPs de Ag mediante técnicas de química verde, usando extractos de partes de plantas de *L. tridentata*, es una técnica original y novedosa que no se ha reportado en México, ni en otras partes del mundo.

1.7. *Larrea tridentata*

Es un arbusto perenne xerófito siempre verde. La edad de esta planta se determina por el tamaño de la corona radicular, la raíz crece sólo cerca de 170 cm hacia abajo, pero se ramifica hasta más de 4 m lateralmente (Brinker, 1993). El tamaño de la planta varía de 0.5 a 4 m en altura dependiendo de la lluvia de invierno o verano, y la altura promedio varía de acuerdo a su raza. No hay un tallo principal, pero las ramas gruesas crecen vertical u oblicuamente desde la corona radicular y se hace dicotómica lateralmente (Coyle y Roberts, 1975). Las hojas son pequeñas y bifoliadas, de un verde oscuro a verde amarillento con cutículas gruesas y una capa

resinosa, tienen pecíolos cortos y crecen opuestas en las ramas (Figura 3). Las flores son amarillas, usualmente aparecen al final del invierno o a principios de la primavera, pero pueden florecer en cualquier momento después de una lluvia; crecen cerca de las terminaciones de los retoños jóvenes como capullos solitarios con cinco pétalos, su polen y néctar atraen muchas abejas (Lira-Saldívar, 2003). Los frutos son pequeños (4 a 7 mm de diámetro), tienen una cubierta vellosa y contienen cinco semillas que se esparcen en primavera y al principio del otoño por el viento y la lluvia (Shreve y Wiggins, 1964; Coyle y Roberts, 1975).



Figura 3 .Follaje de un arbusto de gobernadora (*Larrea Tridentata*).

L. tridentata domina aproximadamente 17.5 millones de hectáreas desde el oeste de Texas hasta el sur de California en los Estados Unidos (Duisberg, 1952). Su rango en el Desierto Mojave va desde la parte sur de California y Nevada a la parte central de Arizona y Nuevo México, limitado por heladas invernales o lluvias excesivas de invierno (Lira-Saldívar, 2003). Su distribución en México se ha registrado en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998). Se estima que el 25% del territorio nacional perteneciente a las zonas áridas está cubierto con este arbusto (Belmares *et al.*, 1979).

Esta especie se caracteriza por presentar poliploides ya que las plantas del Desierto Chihuahuense son diploides ($n = 13$), las del Sonorense son tetraploides ($n = 26$) y las del Mojave son hexaploides ($n = 39$; Sakakibara *et al.*, 1976; Mabry *et al.*, 1977).

Esta planta es muy vigorosa, adaptada para sobrevivir en el desierto, posee la habilidad para mantener actividad fotosintética neta, aún a potenciales de presión de agua muy bajos. Su adaptación a tales ambientes (áridos y calientes) es debida a su alto nivel de tolerancia protoplásmica a la desecación y a las altas temperaturas. (Vázquez *et al.*, 1999.)

1.7.1 Constituyentes fitoquímicos.

Los principales compuestos en la resina de *L. tridentata* reportados en la literatura son numerosos, sin embargo, en el Cuadro 1 se presenta un resumen de los más importantes.

Cuadro 1. Principales constituyentes fitoquímicos de *Larrea tridentata*

Peso seco (%)	Tipo	Compuesto
16-21	Lignanos Fenólicos	Ácido Dihidroguaiarético Hemi-norisoguaiacin Ácido nordihidroguaiarético Nordihidroguaiacin
5-7.5	Flavonoides	Apigenin Kaempferol
10-15	Saponinas	Larreagenin A
0.1-0.2	Triterpenos Monoterpenos Volátiles Hidrocarbonos 35 Aromáticos	Ácido Larréico Alpha penene Delta-3-carene Limoneno Benzaldeído Benzilacetato Benzilbutano

70.1(de tallos) 16.6	Esteroides	Metil naftaleno Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos Carbohidratos	Glucosa Sucrosa
15.6 mg/lb 19.8 mg/100 g 13.7	Lípidos Aminoácidos	Alkil esterres (C46-C56) Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspártico
	Vitaminas	Glicina Caroteno Vitamina C
	Minerales	Sodio Potasio Calcio Magnesio Hierro Azufre Fósforo

- Tomada de Brinker (1993).

Destacan por su mayor contenido en base al peso seco del follaje los lignanos fenólicos, seguidos por las saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales. El compuesto más importante que se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidermales superior e inferior de las hojas y tallos es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), uno de los antioxidantes mejor conocido (Seigler *et al.*, 1974). Químicamente se le ha descrito como beta, gamadimetil-alfa, delta-bis (3,4-dihidroxifenil) butano. Se ha determinado que este ácido tiene propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, citotóxica, antimicrobial e inhibidor de enzimas (Mabry *et al.*, 1977; Fernández, 1979; Brinker, 1993).

El propósito del NDGA y su derivativo o-quinona es evidentemente un repelente de herbívoros (Rundel *et al.*, 1994). Estudios interpoblacionales de *L. tridentata* realizados en el Desierto Sonorense revelaron que las concentraciones de NDGA encontradas en la resina de sus hojas variaron en función de la latitud y de la época del año (Downum *et al.*, 1988), así como con factores ecológicos, ya que la concentración de NDGA puede reducirse por la contaminación ambiental provocada por concentraciones elevadas de ozono (González-Coloma *et al.*, 1988). También hay más de 20 flavonoides metil aglyconas que constituyen la otra mitad de la resina. Los posibles efectos de todos los diferentes flavonoides y otros constituyentes son numerosos y variados. Los efectos combinados de estos constituyentes apuntan hacia un sinergismo que amplía el efecto del compuesto activo primario (NDGA), esto sugiere la ventaja de usar un extracto de la estructura entera hoja/ramas en comparación con usar una preparación de NDGA purificado o sintetizado (Lira-Saldívar, 2003).

1.7.2 Propiedades antimicrobiales

Numerosos estudios han demostrado que los extractos de gobernadora tienen acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia económica sintetizado (Lira Saldívar, 2003). Se ha reportado que la resina extraída de *L. tridentata* muestra actividad fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium spp* y otros hongos fitopatógenos (Brinker, 1993). Por su parte, (Verástegui *et al.* 1996) determinaron el efecto de extractos etanólicos de *L. tridentata* en el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias que afectan la salud de humanos y animales. Sus resultados mostraron que los extractos inhibieron diversos actinomicetos y hongos.

El trabajo de Brinker (1993) enfocado a los usos etnobotánicos de *L. tridentata*, ha reportado que más de 45 bacterias, 10 levaduras, nueve hongos y tres parásitos intestinales son susceptibles a la resina de *L. tridentata* o sus

constituyentes. La resina de gobernadora ha probado tener efectos bactericidas y bacteriostáticos a bajas dosis, como lo demuestra el trabajo de (Velásquez, 1983) al evaluar *in vitro* diversas dosis del extracto etanólico contra las bacterias fitopatógenas.

1.8. Importancia del tomate en México y características de ciertas enfermedades bacterianas

El tomate es una planta de la familia de las Solanáceas, cuya especie básica es *Lycopersicon esculentum* Mill. México ocupa la décima posición mundial, con el 1.9 por ciento de la superficie cosechada de esta hortaliza (FIRA, 2016). Además fue el principal exportador de tomate en 2014 en términos de volumen, sin embargo en cuanto al valor de las ventas al exterior, fue superado por Holanda (FIRA, 2016). Desde el punto de vista económico, el tomate es una de las especies hortícolas más importantes de nuestro país debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera; además, es el principal producto hortícola de exportación (Ortega, 2010).

La producción de tomate está altamente concentrada; en cinco entidades se produjo el 54.1 por ciento del total nacional en 2015: Sinaloa (27.4 por ciento), Michoacán (7.2 por ciento), San Luis Potosí (7.2 por ciento), Baja California (7.1 por ciento) y Jalisco (5.2 por ciento) (FIRA, 2016). Sin embargo Medina-Ríos (2011), menciona que en los últimos años, la superficie dedicada al cultivo de tomate ha disminuido gradualmente, debido a diversos factores; entre ellos, la incidencia creciente de plagas y enfermedades.

Las plagas más comunes son: la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), pulgones o áfidos (*Mizus persicae*), trips (*Frankiniella occidentalis*), y el minador de la hoja (*Lyriomisa sativae*; SAGARPA, 2010). Las enfermedades bacterianas más comunes son: cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis*; Gleason *et al.*, 1993), la

podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), tizón temprano (*Alternaria solani*), cenicilla polvorienta (*Oidiopsis taurica*; León-Gallegos, 1998; Félix-Gastélum *et al.*, 2012), el tizón tardío (*Phytophthora infestans*; Félix, 1993; Félix-Gastélum *et al.*, 2012), y la marchitez vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*; González y Peteira, 2012).

El control de estas plagas y enfermedades es a través de insecticidas sintéticos y productos químicos; sin embargo, su aplicación aumenta los costos de producción y su uso indiscriminado ha incrementado el número de problemas ecológicos, tales como, desarrollo de resistencia de patógenos y plagas en plantas, desarrollo de contaminación e impactos negativos a la salud humana, entre otros (Nuez *et al.*, 1995; Matson *et al.*, 1997).

1.8.1 Características de *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum es un hongo filamentoso, pertenece al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Nectriaceae (Michelse y Rep, 2009). Es un género que cuenta con especies patogénicas y especializadas, responsables de enfermedades en cultivos específicos (Leslie y Summerell, 2006). Entre las enfermedades más importantes que afectan al tomate se encuentra la marchitez vascular, cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (González y Peteira, 2012), esta hongo se ha convertido en una limitante en zonas productoras de cebolla y ajo (Kiehr y Delhey, 2005).

Las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular (Turlier *et al.*, 1994). Esta enfermedad ha tenido mayor incidencia durante los últimos años debido a que *Fusarium* spp se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, lo que puede estar relacionado con su capacidad de reproducción asexual (Michelse y Rep, 2009).

1.8.2 Características de *Alternaria solani*

Alternaria contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos; como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos y perjudiciales como las micotoxinas; al mismo tiempo, como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados (Andersen *et al.*, 2001). Nombre Científico: *Alternaria solani* (Ell. And Mart.) Jones y Grout. (Clase: Deuteromycetes, Orden: Moniliales, Familia: Dematiaceae (Dillard *et al.*, 1995.).

El tizón temprano del tomate causado por el hongo (*Alternaria solani* Sorauer) se encuentra distribuido en todas las zonas productoras de tomate del mundo, y puede llegar a ser una importante enfermedad si se dan las condiciones ambientales favorables para su desarrollo (Momol y Pernezny, 2006; University of California IPM program, 2009).

La enfermedad se presenta en hojas, tallos y frutos. Aparece en cualquier época del desarrollo del cultivo; cuando ataca en estado de plántula, estas presentan una pudrición del cuello en el tallo al nivel del suelo (Espinosa, 2004). *Alternaria solani* produce estructuras de resistencia llamadas clamidosporas, que son capaces de sobrevivir en el suelo o residuos de cosecha por un periodo de tiempo. El patógeno se puede transmitir por semilla, debido a esto, puede afectar semilleros y plantas de trasplante. La enfermedad también ataca a otras solanáceas como papa y berenjena. Las esporas del hongo se diseminan por el viento y el agua de lluvia (Gómez *et al.*, 2011).

1.8.3 Características de *Clavibacter Michiganensis*

Clavibacter se clasifica como un miembro de la familia Microbacteriaceae, de acuerdo con el análisis de secuencias del 5S RNAr (Park *et al.*, 1993). *Clavibacter michiganensis* es la única especie del género *Clavibacter* y se divide en cinco subespecies de acuerdo al hospedero que infecta (Romero-García, 2011).

Estas cinco subespecies son *michiganensis*, que infecta a plantas de jitomate y chile, *sepedonicus*, que provoca la podredumbre anular de la papa, *nebraskensis* responsable de la marchitez y el tizón del maíz; *tessellarius*, que induce en las hojas de trigo pecas y manchas, y por último *insidiosus*, patógeno que causa marchitamiento y retraso en el crecimiento de la alfalfa (Jahr *et al.*, 1999; Eichenlaub *et al.*, 2006).

Clavibacter michiganensis subsp. *Michiganensis*, se caracteriza por una serie de síntomas que pueden ser influidos por las condiciones ambientales, edad de la planta, susceptibilidad de los cultivares y la forma de entrada de los patógenos (Gleason *et al.*, 1993). El agente etiológico del cáncer bacteriano actualmente se conoce como *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Davis *et al.* 1984). Las semillas son el principal vector pasivo a larga distancia y el comercio facilita la distribución o diseminación de la enfermedad en todo el mundo (De León *et al.*, 2008).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en las instalaciones en el departamento de agroplásticos perteneciente al Centro de Investigación en Química Aplicada durante el periodo julio-noviembre del 2017.

2.2 Material vegetal

Se colectaron hojas de plantas provenientes de Saltillo, el día 18 de Marzo de 2017 en la siguiente ubicación: N 25°13'03.7" W 101°03'48.7", altitud 2198 m. Cabe señalar que las plantas se encontraban en etapa de floración, estas plantas fueron elicidadas con etanol grado reactivo a campo abierto, este fue asperjado al follaje. Después de la aplicación las plantas fueron cubiertas con una lona plástica para crear un microclima por 2 h, con el objetivo de activar los mecanismos de defensa de la planta, y de esta manera poder tener en mayor proporción enzimas y metabolitos secundarios relacionados con las respuestas a estrés abiótico, los cuales pueden actuar como agentes reductores. Las hojas del follaje fueron obtenidas realizando cortes de las ramas con tijera y congeladas inmediatamente con ayuda de hielo seco, para ser transportadas al laboratorio de Agrobiotecnología en el CIQA, en donde las muestras se congelaron a -80 °C. Posteriormente las hojas se molieron con ayuda de una licuadora comercial (manteniendo la cadena de frío, con ayuda de nitrógeno líquido) para obtener un polvo el cual fue liofilizado. El liofilizado de las hojas se guardó en bolsas para utilizarlo como materia prima para obtener los extractos que se emplearon en la biosíntesis de nanopartículas de plata (NPs de Ag).

2.3 Preparación de extracto

La preparación del extracto se llevó a cabo modificando metodologías reportadas para la preparación de nanopartículas (Krishnaraj *et al.*, 2016; Malabadi *et al.*, 2015). A partir de 20 g de biomasa liofilizada provenientes de hojas de *L. tridentata*, se prepararon 3 tipos de extractos en una proporción 1:10 (p/v): 1) Acuoso, el cual se preparó por decocción, calentando agua desionizada a 60 °C, en donde se dejó reposar el liofilizado por 1 h manteniendo la temperatura, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se eliminaron los restos celulares por filtración con papel filtro de poro mediado; 2) Hidro-alcohólico, se utilizó una solución etanol: agua desionizada en una relación 70:30, para extraer los compuestos la solución se sónico por 30 min; 3) Metanólico, se utilizó metanol grado reactivo sin diluir, la muestra se sónico por 30 min; 4) Etanólico, se utilizó etanol grado reactivo sin diluir, la muestra se sónico por 30 min, pasado el tiempo se eliminaron los restos celulares se eliminaron con papel filtro de poro mediano, el filtrado se guardó en refrigeración hasta su uso, con un tiempo máximo de almacenamiento de 30 días.

2.4 Biosíntesis de las nanopartículas de plata

Para la preparación de las NPs de Ag se llevaron modificaciones de metodología reportada para la preparación de estas con otros extractos vegetales. Se utilizó una solución 50 mM de AgNO₃ la cual se mezcló en una proporción 5:1 con el extracto obtenido de *L. tridentata*, la solución se agitó a temperatura ambiente por 2 h (Tippayawat *et al.*, 2016; Logeswari *et al.*, 2015). Se probaron diferentes condiciones de tiempo y temperatura. El precipitado obtenido se colectó por centrifugación a 5000 rpm por 5 min, se realizó un lavado con agua desionizada, seguido de tres lavados con metanol, se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Se optimizó los siguientes factores pH, tiempo, concentración de sales, concentración de la relación extracto de planta sustrato para poder tener una síntesis rápida de nanopartículas estables.

2.5 Caracterización de las nanopartículas

Para determinar la síntesis de NPs de Ag, se analizó el espectro de absorción de las muestras a 300-540 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis (GENESIS 10uv). Se utilizó como blanco: el extracto de *L. tridentata*. Se realizó la caracterización de NPs de Ag obtenidas por difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X de las NPs, realizando la identificación de las fases cristalinas por comparación con difractogramas experimentales y los reportados en el banco de datos del International Centre for Diffraction Data. El tamaño de las cristalitas se determinó con la ecuación de Scherrer aplicada a los difractogramas. Adicionalmente se obtuvieron micrografías de TEM de las NPs obtenidas, para determinar su forma y tamaño. Y se confirmó la composición elemental con Espectroscopía de Rayos X (EDS o EDX).

2.6. Actividad antifúngica

Las cepas utilizadas en este proyecto de *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*, fueron adquiridas de la colección del departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Estas fueron multiplicadas a través de explantes en Agar Papa Dextrosa adicionado con extracto de malta y extracto de levadura. Posteriormente se llevó a cabo el método de purificación por punta de hifa para la obtención de cultivos monopólicos logrando reducir la mayor cantidad de variables que pudieran afectar nuestro experimento. Finalmente se reprodujeron los cultivos puros.

2.6.1 Evaluación de efecto antifúngico de nanopartículas de plata *in vitro*

Para evaluar la actividad antifúngica de las NPs Ag contra las dos cepas de hongos fitopatógenos se utilizó la metodología de medio envenenado descrita por Corrales Flores (2014). En este estudio se manejaron las siguientes concentraciones de NPs Ag: 0, 100, 250, 500, y 700 mg L⁻¹. Se preparó medio PDA (Agar Papa Dextrosa) adicionado con extracto de malta y extracto de levadura, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Al mismo tiempo se prepararon una solución de las nanopartículas en 10 mL de agua destilada estéril, la cantidad tomada de esta solución madre de NPs de Ag dependió de la concentración final deseada. Las NPs de Ag se dispersaron por sonicación en tres ciclos de 15 min. Finalizada la esterilización del medio PDA se dejó enfriar, y se completó con la solución de NPs previamente sonicadas, agitando un breve momento para lograr la homogenización de la solución con el medio y por último se vacía en las cajas Petri.

Para el establecimiento del ensayo los hongos son inoculados por medio de explante en los medios previamente descritos y se incubaron a 27 °C de 7 a 11 días dependiendo de la cepa utilizada. Los parámetros evaluados fueron el diámetro de crecimiento el cual se midió con ayuda de un vernier, para poder calcular el porcentaje de inhibición con la fórmula descrita por Orbera *et al.*, (2009):

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

Dónde:

PICR= Es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

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

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

Para concluir se realizó un análisis de varianza y comparación de medias a través de (Duncan $\alpha=0.05$) con un diseño experimental completamente al azar.

Cuadro 2. Nanopartículas de plata a diferentes concentraciones utilizadas *in vitro* contra hongos fitopatógenos.

Tratamiento	<i>Alternaría solani</i> (mg L ⁻¹)	<i>Fusarium oxysporum</i> (mg L ⁻¹)
1	0	0
2	100	100
3	250	250
4	500	500
5	700	700

2.7. Actividad antibacteriana

2.7.1 Preparación del inóculo de la cepa bacteriana

Se utilizó la cepa de *Clavibacter michiganensis*, la cual se obtuvo de la colección del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) .La bacteria se sembró por estría en medio de cultivo King de B (KB) y se incubaron a 35 ± 2 durante 24 h. La bacteria se propago en medio de cultivo King's B (KB) sólido y líquido, el cual se prepara con 20 g L⁻¹ de proteasa peptona, 1.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄·3H₂O, 1.5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O y 15 mL de glicerol. Para gelificar se utilizó 15 g L⁻¹ de agar bacteriológico. El medio se esterilizo en autoclave a 121 °C por 15 min. Para preparar los medios con NPs de Ag, estas

fueron pesadas de acuerdo a la concentración deseada, posteriormente se dispersan en medio KB mediante sonicación en tres ciclos de 15 min.

A partir de las células crecidas en medios sólidos, se tomaron tres colonias grandes y se resuspendieron en 3 ml de medio KB, se incubaron en agitación 110 rpm a una temperatura de 37°C por 24 h. Posteriormente, se adicionó 1 mL de este cultivo aun matraz con medio de cultivo preparado previamente, el cual sirvió de inóculo para los ensayos. El inóculo se incubó durante 24 h, hasta alcanzar una densidad óptica (DO600) de aproximadamente 1 unidad absorbancia a 600 nm. Para inocular los matraces de 250 mL que se utilizaron 2 mL del inóculo para cada repetición de las diferentes concentraciones (0, 100, 250, 500, 700 mg L⁻¹). Los medios de cultivo inoculados se incubaron a 37°C a 100 rpm.

2.7.2 Determinación de la concentración celular

Se tomó muestra de 1 mL en condiciones de esterilidad cada 2 horas incluyendo el tiempo cero. A cada muestra se le determino la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10uv). Los ensayos se realizaron por triplicado en forma independiente. Cabe resaltar se llevó a cabo un ensayo previo el cual consistió en una cinética de crecimiento para conocer las etapas de crecimiento de la bacteria (Fig. 4). Por último se calculó porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano de *C. michiganensis* por densidad óptica para evaluar el potencial antibacteriano de las NPs de Ag.

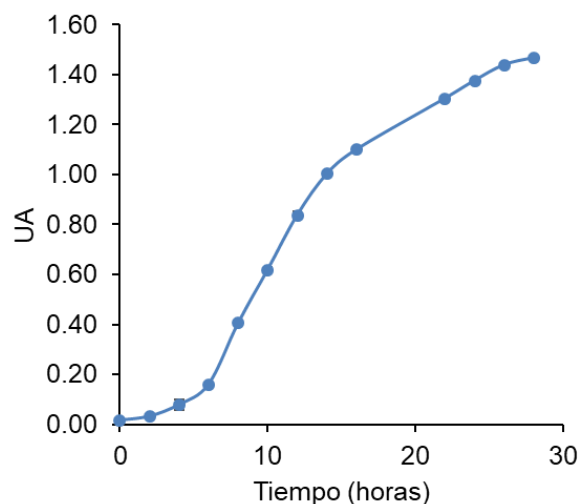


Figura 4. Cinética de crecimiento de *C. michiganensis* en medio King's B.

2.8 Evaluación de la aplicación de nanopartículas de Ag en plántulas de *S. lycopersicum*

Con el objetivo de evaluar el efecto que pudieran tener las NPs de Ag sobre el crecimiento de plántulas de *S. lycopersicum* al ser utilizadas como antagonista de hongos y bacterias *in vivo*.

El experimento se llevó a cabo en plántulas de tomate en condiciones de cámara de crecimiento, con 4 tratamientos y 7 repeticiones cada uno con las siguientes concentraciones de NPs de Ag: 0, 25, 50 y 100 mg L⁻¹ para el caso del control se usó agua desionizada. Previo a su uso las soluciones de NPs de Ag fueron dispersadas con un Sonicador por 30 min en dos tiempos de 15 min. Las semillas de tomate fueron en imbibidas por 18 h en las concentraciones mencionadas de NPs de Ag: Pasado el tiempo, las semillas se sembraron en charolas de germinación con 36 cavidades utilizando como sustrato turba (Peat Moss).

Los sustratos usados fueron previamente esterilizados para eliminar la presencia de fitopatógenos, se utilizó turba y Perlita en proporción de 3:2. El trasplante se realizó en vasos de polietileno de 400 mL de capacidad, cuando las plántulas presentaron un par de hojas verdaderas y una altura adecuada. Durante el desarrollo de la plántula se aplicó riego manualmente y se fertilizó cada tercer día con una solución de un fertilizante comercial FertiDrip 20-20-20 más microelementos. La aplicación foliar de las NPs de Ag se realizó de manera manual una vez por semana, se asperjó 1 mL de la solución planta sobre haz y envez para cubrir el follaje, la duración del experimento fue de 21 días. Se registraron las siguientes variables: altura de la planta, área foliar (LI-COR modelo LI-300, Lincoln, Nebraska, USA), índice de clorofila (Minolta SPAD 502), longitud de raíz y biomasa seca (hojas, tallo, raíz). Estas mediciones se hicieron al final del experimento en todas las plantas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Preparación y evaluación del extracto de *L. tridentata* como agente reductor en la biosíntesis de nanopartículas de plata

La síntesis verde de NPs de Ag implica tres pasos principales, que deben evaluarse en función de las perspectivas de la química verde, incluyen (1) la selección del medio disolvente, (2) la selección de agentes reductores benignos para el medio ambiente y (3) la selección de sustancias no tóxicas para la estabilidad de NPs de Ag. De acuerdo con lo anterior, se realizaron los experimentos pertinentes, con el fin de evaluar la utilización de extractos de *Larrea tridentata* como agente reductor para la producción de NPs metálicas.

Se utilizaron cuatro tipos de extracciones con el objetivo de extraer la mayor cantidad de metabolitos secundarios que pudieran estar involucrados en la reducción del metal, acuoso (AQ), Hidro-alcohólico (HA), metanólico (MET) y etanólico (ET), los cuales se describió el proceso de preparación anteriormente. Se evaluó la capacidad de cada uno para producir las NPs de Ag, para lo cual se preparó una solución de AgNO₃ (50 mM) a la cual se adicionó el extracto de *L. tridentata* en una proporción 5:1 (AgNO₃: Extracto) de acuerdo a la metodología descrita por Hernández-Pinero y colaboradores (2016).

La presencia de nanopartículas en la mezcla de reacción se sugirió en primer lugar por un cambio de color, que tuvo lugar 2-3 min después de añadir el precursor a las soluciones de extracto, esta cambiaba de un color marrón a uno de coloración oscura (Figura 5).

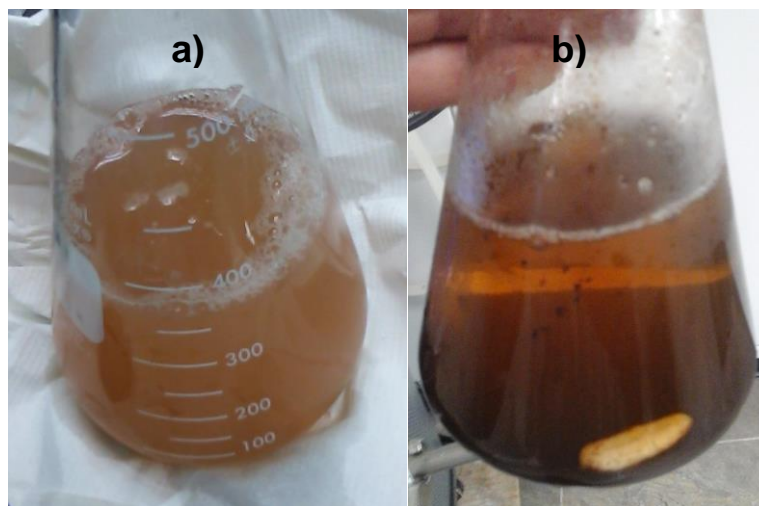


Figura 5. Extracto de *L. tridentata* con nitrato de plata antes (a) y después (b) de la formación de nanopartículas.

La reducción de nitrato de plata durante la exposición a los extractos de plantas van seguidos de un aumento gradual en el desarrollo del color de claro a marrón amarillento, como resultado de la superficie fenómeno de resonancia de plasmones (Vijayakumar *et al.*, 2013). Para poder corroborar lo anterior se realizó un análisis UV-vis de la mezcla de reacción, con este análisis que muestro un cambio en la intensidad en la absorbancia se demostró el efecto del extracto obtenido de *L. tridentata* para producir NPs de Ag (Figura 6).

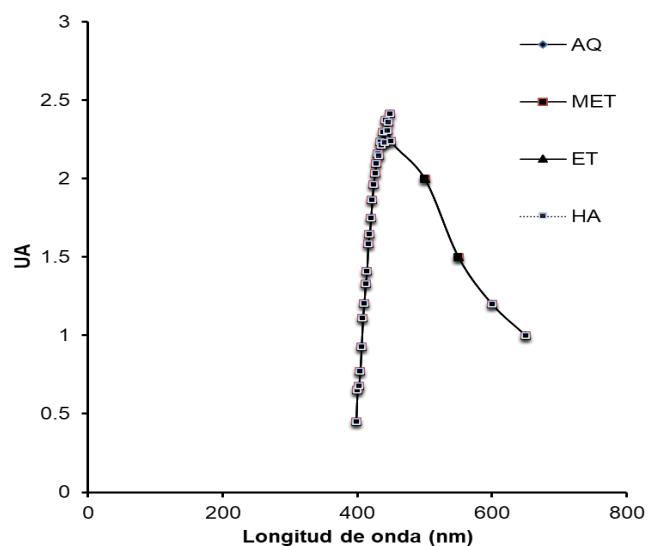


Figura 6. UV-vis de nanopartículas de plata obtenidas con los diferentes extractos de *L. tridentata*.

La figura 6 muestra el pico característicos de absorbanza de la Ag metálica, el cual se presenta alrededor de los 425 nm cuando el tamaño de partícula varía entre los 2 y los 40 nm (Rodríguez-León *et al.*, 2013). Es un método (indirecto) para examinar la biorreducción de las NPs de Ag en la solución acuosa de AgNO_3 . Es por esta razón que las condiciones óptimas de síntesis se escogieron en función de los espectros UV-Vis realizados para cada síntesis. Debido a los resultados anteriores concluimos que cualquiera de los extractos utilizados tenía la capacidad de producir NPs de Ag; sin embargo, elegimos al extracto acuoso por ser el más sencillo de obtener y por ser amigable con el medio ambiente al no utilizar ningún tipo de solvente. El siguiente paso fue evaluar la temperatura de síntesis, diversos autores señalan que hay una relación entre la temperatura de síntesis y el tamaño de nanopartículas bio-sintetizadas (Nemati *et al.*, 2018; Hernández-Pinero *et al.*, 2016).

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos, en donde además de evaluar el efecto de la temperatura evaluamos la adición de un estabilizante dodecilsulfato sódico (SDS) a una concentración del 8 % de acuerdo a la metodología reportada por Vijayakumar et al. (2013), ya que han reportado a que este tipo de surfactantes cuaternarios controlan el tamaño de la nanopartícula (Zhang et al., 2008). Las temperaturas ensayadas fueron temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y un baño de hielo el cual se encontraba a una temperatura de 10 ± 1 °C, a estas dos temperaturas a cada una de las temperaturas ensayadas se utilizó SDS. Sin embargo, estas no mejoraron la amplitud de los espectros de absorción, pero si el baño en hielo hizo que este fuera más angosto, lo que nos habla de la formación de nanopartículas más homogéneas y de menor tamaño de acuerdo por lo reportado por (Hernández-Pinero et al., 2016).

A temperaturas mayores, el pico de absorción máxima se desplaza hacia longitudes de onda mayores y se obtiene nanopartículas de mayor tamaño. Resultados similares presentan Verma y Mehata (2016). Por otro lado, una menor temperatura permite el control de la dispersión en el tamaño de las nanopartículas.

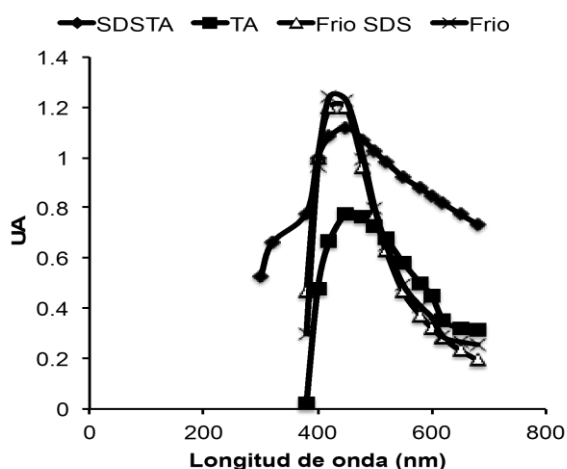


Figura 7. Bio-reducción de nanopartículas de plata a dos temperaturas.

Como se puede apreciar en la Figura 8, las nanopartículas de plata presentaron la apariencia de un material sólido de color gris oscuro que al aplicar presión en el tacto mantenía su forma(a), por este motivo se trituró el material sólido utilizando un mortero, hasta la obtención de un polvo fino (b), esta muestra se guardó y etiquetó en un tubo de microcentrifuga para su posterior caracterización.

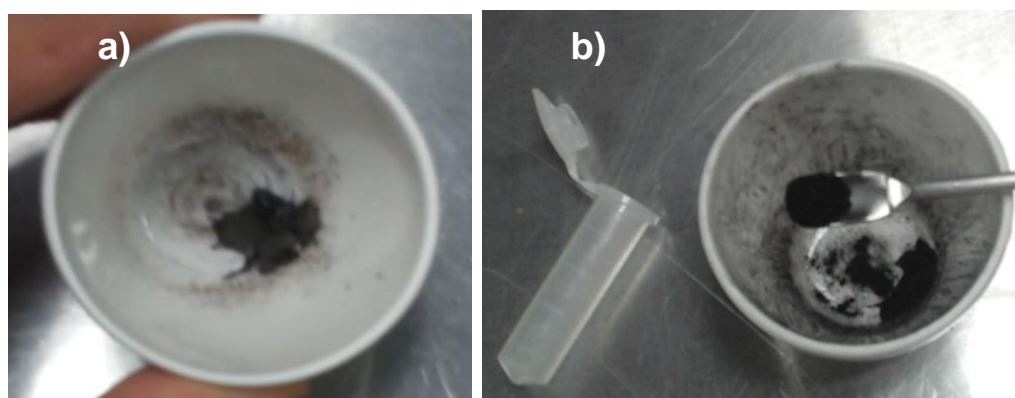


Figura 8. a) Material sólido obtenido del proceso de biosíntesis de nanopartículas de Ag, **b)** trituración del material sólido.

3.2 Caracterización de nanopartículas de plata por difracción de rayos X

El patrón de difracción de las NPs de Ag se presenta en la Figura 9. Para facilitar la identificación de la naturaleza y estructura cristalina de las nanopartículas de plata presentes, obtenidas con el extracto de *L. tridentata*, se realizó el análisis de las fases cristalina de la plata mediante difracción de rayos X, estos datos se compararon con los reportados en el banco de datos del ICDD (International Centre for Diffraction Data). En el patrón de difracción se detectaron las reflexiones características de la plata (Ag) y cloruro de plata (AgCl), que demuestra la cristalinidad de dichas fases (Figura 9), se muestran cuatro picos de difracción en la posición angular a $2\theta = 38^\circ, 44^\circ, 65^\circ$ y 78° , los cuales están indexados para los planos 111, 200, 220 y 311 respectivamente, reflexiones de la red cubica centrada

en las caras de la plata metálica, consistente con los datos de Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) archivo [99-101-3078]. Se descarta contenido de cloruros en el agua, esto porque se usó agua desionizada para la solución acuosa de AgNO_3 por lo cual, la presencia de cloruro se puede atribuir al extracto acuoso de *L. tridentata*, que al ser mezclado con la disolución acuosa de nitrato de plata (AgNO_3 de baja solubilidad) esta reacción precipita en cloruro de plata (AgCl) (Universidad Nacional del Litoral, 2013).

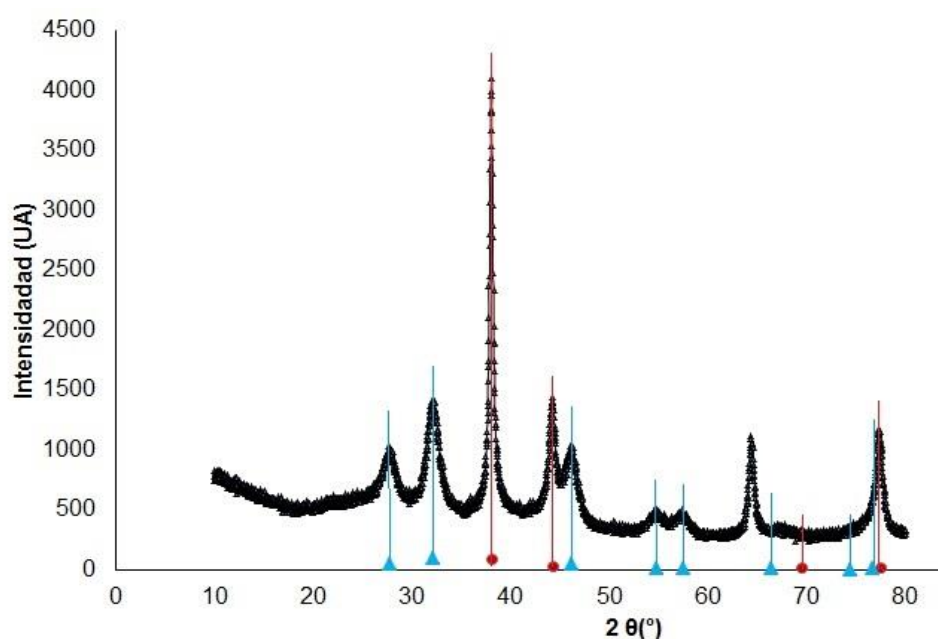


Figura 9. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de plata obtenidas usando el extracto de *L. tridentata*. En color rojo (plata) y en azul (cloruro de plata).

3.3 Análisis de morfología y tamaño de las nanopartículas de plata biosintetizadas por medio de Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Las nanopartículas obtenidas de la reacción empleando el extracto de *L. tridentata* (gobernadora) como agente reductor, se caracterizaron a través de microscopia electrónica de transmisión (TEM) para evaluar la morfología y el tamaño de las mismas. En la Figura 10 se muestran micrografías de las nanopartículas donde se puede observar que la mayoría de las nanopartículas presentaron una morfología esférica, aunque se llegaron a observar algunas ligeramente ovoides o semiesféricas.

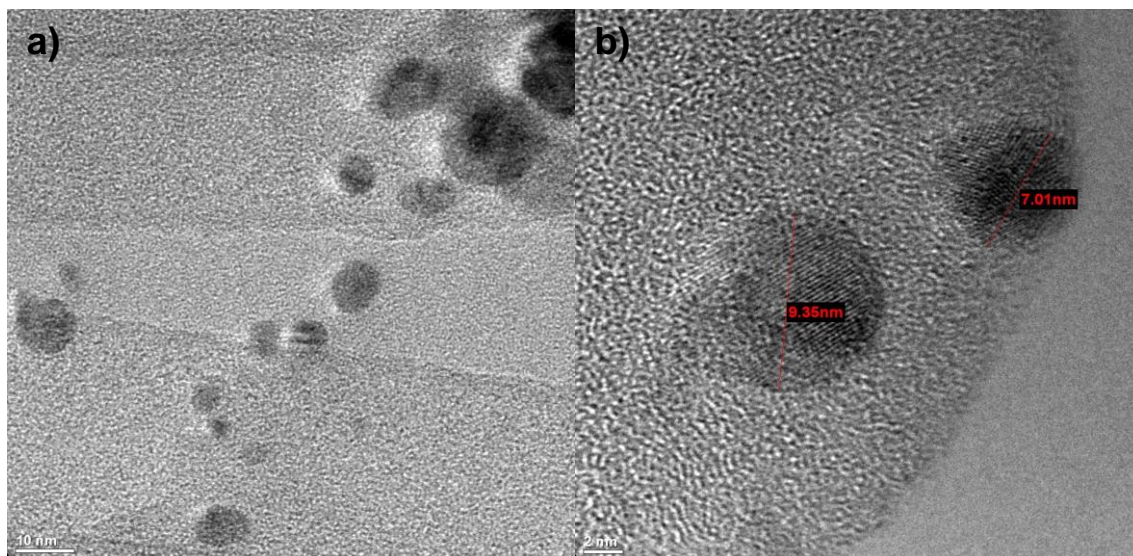


Figura 10. Micrografías TEM de nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de *L. tridentata* como agente reductor **a)** morfología, **b)** diámetro.

En la figura 11 se muestra un histograma de distribución del tamaño promedio de las NPs de Ag, el cual fue de 9 nm con un amplio intervalo de diámetro de partícula de 5 a 25 nm. En la curva de distribución, se puede observar asimétrica y tiende a concentrarse en los intervalos de diámetros de 5-13 nm, lo que indica que la distribución no fue muy homogénea y se generó una mayor concentración de nanopartículas con intervalos menores a los 13 nm.

En la literatura se reporta la obtención de NPs de Ag con tamaños desde 2 nm hasta 50 nm empleando extractos vegetales como agentes de reducción, pero en algunos casos la morfología que se presenta no es uniforme, es decir generalmente se presentan al final de las reacciones una mezcla de morfologías (Sapkota et al., 2018; Nagati et al., 2018; Balashanmugam y Kalaichelvan, 2015). Sin embargo en nuestro caso fue posible obtener partículas de orden nanométrico con morfología predominantemente esférica utilizando extractos acuosos de hojas de *L. tridentata*.

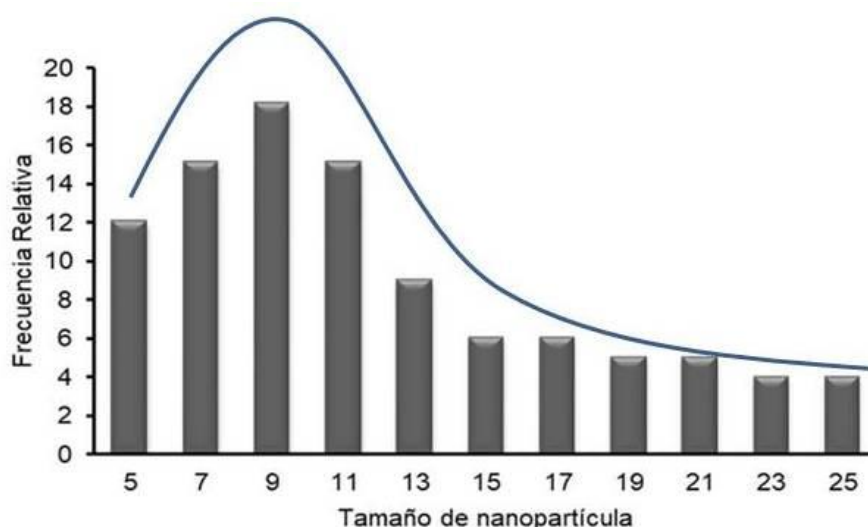


Figura 11. Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de *L. tridentata* como agente reductor.

En la Figura 12 se muestra el espectro EDX (Espectroscopía de Rayos X) de las NPs de Ag, mediante el cual se confirmó que la composición elemental de la muestra correspondía a plata y a cloruro de plata. Además se observan las señales de carbono y oxígeno propias del material vegetal de *L. tridentata*, junto con señales de plata debidas a la presencia del nanomaterial depositado sobre una cubierta orgánica.

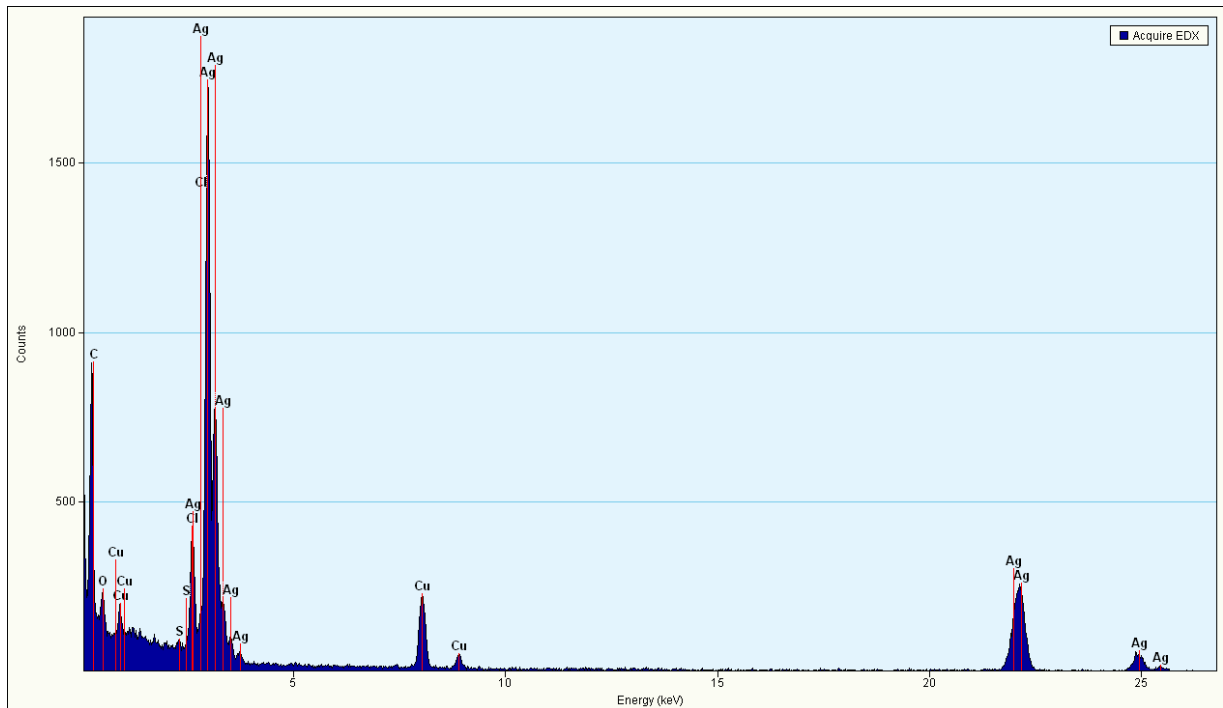


Figura 12. Espectro EDX de Nanopartículas de plata obtenidas empleando el extracto de *L. tridentata*.

3.4 Actividad antifúngica

Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de dos cepas de hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. solani*, para evaluar el potencial antifúngico de las NPs de Ag a diferentes concentraciones (0, 100, 250, 500, y 700 mg L⁻¹).

La evaluación de crecimiento para ambas cepas se realizó cuando las cepas control alcanzaron el 100% de crecimiento micelial, esto fue 7 días para *A. solani* y 11 días para *F. oxysporum* después de siembra. En el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos en el experimento de nanopartículas de plata por los diferentes tratamientos, se utilizaron tres fungicidas comerciales como control positivo Amistar (Syngenta), Bemil (Dragón) y Rally (Dow AgroSciences).

El incremento en las concentraciones de NPs de Ag se correlacionó con el efecto antifúngico de las mismas, las NPs de Ag mostraron un efecto diferencial entre cepas siendo más efectivo en inhibir el crecimiento de *A. solani*. Sin embargo, solo logro inhibir el crecimiento micelial en un 43.32 % a la concentración de 700 mg L⁻¹. En el caso de *F. oxysporum* la inhibición del crecimiento fue menos efectiva, ya que solo pudo inhibir el crecimiento del hongo en 25.94 % a la concentración más alta utilizada en estos ensayos.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* y *A. solani*.

Cepa	Concentración (mg L ⁻¹)			
	100	250	500	700
<i>F. oxysporum</i>	7.77±0.78C	8.10±0.67C	21.50±1.08B	25.94±1.56A
<i>A. solani</i>	15.73±0.67D	30.99±1.91C	38.99±0.89B	43.32± 0.74A

*Análisis de comparación de medias (Duncan $\alpha=0.05$). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Uno de los posibles motivos de que no se lograra inhibir el crecimiento micelial en un mayor porcentaje, es debido a que los hongos son muy tolerantes a los metales y presentan una gran capacidad de bioacumulación (Ouahid Hessissen, 2016), además de que muchos metales son micronutrientes y pueden tolerar concentraciones elevadas de estos (Akhtar, 2015). Otra hipótesis de este comportamiento es debido a la presencia de NPs de cloruro de plata que se encuentran presentes, en las NPs biosintetizadas por el extractos, ya que de acuerdo a Jo y colaboradores (2009) en donde aplicaron varias formas de iones de plata y nanopartículas (AgNO₃, AgCl y NPs de Ag) para examinar la actividad antifúngica en dos hongos fitopatógenos, *Bipolaris sorokiniana* y *Magnaporthe grisea*, los ensayos *in vitro* indicaron que los iones de plata y las nanopartículas inhibieron el crecimiento de estos dos patógenos, diferencialmente como lo observado en este estudio.

Sin embargo, la presencia de iones cloro disminuía la efectividad de las sales utilizadas, ellos sugieren que aunque se conoce que el AgCl puede tener actividad antimicrobial, esta puede ser insoluble y por eso no es tan eficaz.

De acuerdo a diversos autores señalan que el efectos antifúngico sobre hongos probados *in vitro* de las NPs de Ag, probablemente es a través de la destrucción de integridad de la membrana, además de que se ha reportado estas interfieren sobre la formación de esporas (Kim et al., 2012).

Por otro lado, se utilizaron como controles positivos antifúngico comerciales, en donde se obtuvieron los siguientes resultados en *F. oxysporum* con Amistar se inhibió el crecimiento micelial en un 28.25%, con Bemil un 79.76% y con Rally 75.36%; en el caso de *A. solani* con Amistar se inhibió un 1.11% el crecimiento micelial, con Bemil un 7.45% y con Rally 79.45% estas fueron utilizadas en las concentraciones que recomienda el proveedor.

De acuerdo a los resultados de los controles positivos (fungicidas comerciales) las NPs de Ag en *A. solani* tuvieron un mejor efecto en las concentraciones 700 mg L⁻¹ en un (43.32±0.74A%), 500 mg L⁻¹ (38.99±0.89B%), 250 mg L⁻¹ (30.99±1.91C%) y 100 mg L⁻¹ (15.73±0.67D%), que el Amistar y el Bemil utilizándose en menores dosis que estos.

3.5 Actividad antibacteriana

Se evaluó la inhibición del crecimiento bacteriano de *C. michiganensis* por densidad óptica para evaluar el potencial antibacteriano de las NPs de Ag (figura 13).

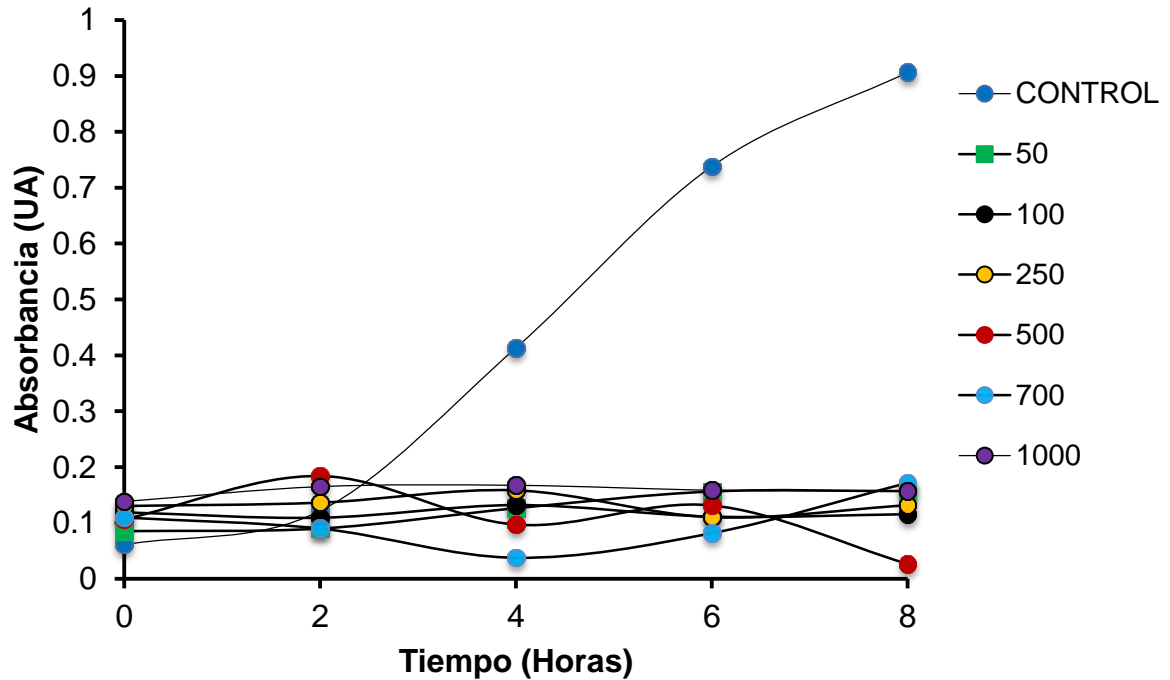


Figura 13. Cinética de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* a diferentes concentraciones de Nanopartículas de plata.

En la figura 13 se muestra una cinética de crecimiento de la *C. michiganensis* en donde se evidencia el poder antibacterial de las NPs de Ag debido a que a la concentración más baja utilizada que fue de 50 mg L⁻¹, no se observó un incremento en el crecimiento bacteriano. El mismo comportamiento se observó para las demás concentraciones en donde se inhibe completamente el crecimiento de la bacteria.

Cabe mencionar que *Clavibacter michiganensis* es un bacilo Gram positivo con un contenido de 73% de Guanina+Citocina en su genoma (Eichenlaub *et al.*,

2006). El cual se caracteriza porque en el peptidoglicano de la pared celular, el aminoácido dibásico es el 2,4-diaminobutírico (Romero García, A. L. 2011). Esto difiere de lo reportado con Shrivastava y colaboradores (2007) quienes sugirieron que las bacterias Gram-negativas son más vulnerables a las NPs de Ag debido a que presentan de cargas positivas en nanopartículas de plata, las cuales interactúan con el lipopolisacárido de la pared celular de estas con mayor afinidad que con la pared celular de las Gram positivas, la cual tiene menos sitios de interacción con cargas positivas, es más rígida y no permite que entren las nanopartículas. Sin embargo, en nuestro caso las NPs de Ag biosintetizadas tienen capacidad antibacteriana contra esta bacteria Gram positiva. Por otro lado, se ha reportado que uno de los mecanismos antibacterianos de las NPs de Ag es que modulan los perfiles de fosfotirosina involucrada en el ciclo celular y en la síntesis de polisacáridos de la capsula bacteriana (Durán *et al.*, 2016).

También el efecto antibacteriano contra cepas Gram positivas se podría deber a los residuos de compuestos de *L. tridentata* los cuales se sabe tiene efecto antimicrobiano contra hongos y bacterias fitopatógenas (Lira-Saldívar, 2003). Valencia y colaboradores (2013) evaluaron el efecto antimicrobiano de NPs de Ag recubiertas con quitosano en *Staphylococcus aureus* que es una bacteria Gram positiva, reportaron que el quitosano no inhibió el crecimiento de este microorganismo, no obstante la mezcla entre quitosano tuvo mejor efecto antagonista que las sales de plata por la acción del quitosano.

Por otro lado, en un estudio con NPs de Ag biosintetizadas con curcumina (fitoquímico) procedente de la cúrcuma, (Cur-NPsAg) de tamaño 25-35nm, fueron igual de efectivas contra Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), y bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, Jaiswal y Mishra, 2018).

Otros de los mecanismos propuestos de la actividad anti-bacteriano por la acción de las NPs de Ag es que estas pueden entrar a la célula, afectando la cadena respiratoria causando la inhibición de la división celular, y por ende, la muerte de la bacteria (Rai *et al.*, 2009). También, al liberar iones de plata interactúan con proteínas de membrana; afectando su permeabilidad; donde puede generar ROS, liberar iones de plata y afectar el ADN (Neal, 2008). Estos iones se enlazan con grupos sulfhidrilos de biomoléculas y con compuestos fosforosulfurados como el ADN inactivando a la bacteria (Le *et al* 2010). Además la actividad microbiana de las nanopartículas dependiera de la cepa, el tamaño y la forma de las nanopartículas (Pal *et al.*, 2007). Por lo que podemos agregar que las NPs de Ag biosintetizadas con extracto de *L. tridentata* son capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

3.6 Comportamiento fisiológico de las plántulas de tomate

Se evaluó el efecto de las NPs de Ag en algunas variables fisiológicas de respuesta de las plantas de *S. lycopersicum* (cuadro 5). Las plantas sometidas a la aplicación foliar de NPs de Ag respecto las plantas control no mostraron diferencias significativas en las variables fisiológicas evaluadas. Solo se observó un incremento del 2% en el índice de clorofila en el tratamiento utilizando una concentración de 50 mg L⁻¹ respecto a las plantas del tratamiento control.

Cuadro 4. Efecto de la aplicación al follaje de nanopartículas de Ag, en diferentes variables fisiológicas de *S. lycopersicum*

Variables	Tratamientos (mg L ⁻¹)			
	0	25	50	100
Área Foliar(cm ²)	218.47±21.80A	215.65±8.53A	215.76±8.64A	203.67±8.93A
Peso fresco Hojas(gr)	7.27±0.82A	8.64±0.30A	7.93±0.32A	7.99±0.46A

Peso seco Hojas(gr)	0.85±0.07A	0.95±0.04A	0.89±0.04A	0.90±0.05A
Peso fresco Tallo(gr)	2.37±0.26A	2.13±0.07A	2.05±0.16A	2.18±0.07A
Peso seco Tallo(gr)	0.24±0.02A	0.24±0.02A	0.21±0.02A	0.21±0.01A
Peso fresco Raíz (gr)	2.00±0.24A	1.94±0.17A	1.68±0.14A	2.05±0.15A
Peso seco Raíz (gr)	0.27±0.02A	0.27±0.01A	0.23±0.02A	0.25±A0.01
Longitud de raíz(cm)	21.21±2.06A	21.14±0.59A	19.11±1.62A	19.77±1.30A
Altura tallo (cm)	15.30±0.50A	15.43±0.57A	14.37±0.26A	14.77±0.62A
Diámetro tallo(cm)	4.20±0.22A	4.31±0.06A	4.17±0.18A	4.98±0.80A
Índice de clorofila (Unidades SPAD)	41.73±2.02B	40.27±1.50B	47.66±1.07A	41.10±1.74B

*Análisis de comparación de medias (Duncan $\alpha=0.05$). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Se ha reportado que las NPs de Ag pueden tener efectos benéficos en el crecimiento vegetal; y desarrollo vegetal (Das *et al.*, 2018). Salama (2012) aplicó foliarmente dosis de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm de NPs de Ag en plantas de frijol y maíz, las aplicaciones diarias con 15 ml de cada concentración durante 12 días, mostraron que bajas concentraciones (20-60 ppm) estas tuvieron un efecto estimulante sobre el crecimiento de las plántulas. Además reporta diferencias significativas en las concentraciones de 20 a 60 ppm en el incremento del diámetro de tallo, longitud de raíz, área foliar, índice de clorofila, concentración de carbohidratos y contenido de proteína en las plantas. Lo anterior concuerda con Savithramma y colaboradores (2012) quienes usaron de NPs de Ag sobre semillas del árbol medicinal *Boswellia ovalifoliolata*, mejoraron la germinación de estas semillas. Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos con NPs de Ag lograron una germinación del 95%, mientras que el testigo solamente obtuvo 70% de germinación. Las semillas de control (agua) llevó más tiempo (10 a 20 días) brotar,

mientras que todos los tratados las semillas brotaron en 10 días. Además observaron un efecto promotor de crecimiento de plántulas de *Brassica juncea*.

Así en el presente trabajo, de forma general, las NPs de Ag aplicadas en tomate, no se aprecian efectos significativos en las variables que se evaluó, pudiera deberse al corto tiempo, tipo, propiedades, medios de exposición y concentración de las NPs que en nuestro caso a estas concentraciones inhiben el crecimiento *in vitro* de *C. michiganensis*, sin afectar el crecimiento y desarrollo de la planta, esto puede considerarse beneficioso para utilizar estas NPs como un antimicrobiano. Debido que existen reportes en donde muestran que a concentraciones altas de NPs de Ag (>80 ppm) indujeron un efecto fitotóxico en las plantas (Salama 2012), además la fitotoxicidad causada por algunas NPs genera un comportamiento impredecible e irregular sobre el estrés oxidativo, que a su vez depende del tipo, concentración, propiedades y medios de exposición de las NPs (Foltete *et al.*, 2011).

4. CONCLUSIÓN

La síntesis de nanopartículas de plata utilizando hojas de *L. tridentata* como agente reductor fue exitosa, demostrando la viabilidad del extracto. Se realizó la optimización de la síntesis a partir de un protocolo definido, logrando parámetros óptimos con una proporción 5:1 (nitrato de plata 50 mM, extracto acuoso) a 10 °C durante 120 min. Se obtuvieron nanopartículas recubiertas con extracto y una distribución de tamaños de 5 a 25 nm medidas por TEM.

Se logró una inhibición del crecimiento micelial de “*in vitro*” en un 43 % por las nanopartículas de plata para los casos probados (*A. solani*), con una concentración de 700 mg L⁻¹. Se obtuvo una inhibición de crecimiento del 100 % contra la cepa bacteriana *C. michiganensis* a concentraciones de 50 mg L⁻¹.

La aplicación foliar en plántulas de tomate con las NPs de Ag biosintetizadas a partir de extractos acuosos de *L. tridentata* no tuvieron efectos negativos en desarrollo y crecimiento de plántulas de tomate, a las concentraciones más altas a las que inhibe el crecimiento bacteriano.

Estos resultados muestran que las NPs de Ag utilizando como agente reductor de estas extractos acuosos de *L. tridentata* pueden tener un buen potencial en la aplicación sustentable en cultivos agrícolas.

Perspectivas futuras

Evaluación *in vivo* en plántulas inoculadas con microorganismos para poder evaluar el antagonismo *in vivo* de NPs de Ag, tanto en condiciones de invernadero como de campo abierto antes de hacer las recomendaciones para su uso.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of advanced research*, 7, 17-28.
- Akhtar, N., Ergen, S.C., Ozkasap, O. (2015). Vehicle mobility and communication channel models for realistic and efficient highway network simulation. *IEEE Transactions on Vehicular Technology*, 64, 248-262.
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1-16.
- Alvarado, R., Solera, F., Vega-Baudrit, J. (2014). Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de zinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15, 134-148.
- Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R.G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research*, 105, 291-299.
- Anjum, S., Abbasi, B.H. (2016). Thidiazuron-enhanced biosynthesis and antimicrobial efficacy of silver nanoparticles via improving phytochemical reducing potential in callus culture of *Linum usitatissimum* L. *International journal of nanomedicine*, 11, 715.
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., Cárdenas, R. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of ethnopharmacology*, 98, 231-239.

- Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente/silver nanoparticles: applications and toxic risks to human health and environment. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7, 1.
- Azam, A., Ahmed, A.S., Oves, M., Khan, M.S., Habib, S.S., Memic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International journal of nanomedicine*, 7, 6003.
- Balashanmugam, P., Kalaichelvan, P.T. (2015). Biosynthesis characterization of silver nanoparticles using *Cassia roxburghii* DC. aqueous extract, and coated on cotton cloth for effective antibacterial activity. *International journal of nanomedicine*, 10(Suppl 1), 87.
- Bar, H., Bhui, D.K., Sahoo, G.P., Sarkar, P., Pyne, S., Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 348, 212-216.
- Barati A. (2010). Nano-Composite Superabsorbent Containing Fertilizer Nutrients Used in Agriculture. U.S. patent application publication. Pub. No.: US 2010/0139347 A1.
- Belmares, H., Barrera, A., Ramos de V.L.F., Castillo, E., Motomochi, V. (1979). Research and development of *L. tridentata* as a source of raw materials. 247-276.
- Berekaa, M.M. (2015). Nanotechnology in food Industry; Advances in food processing, packaging and food safety. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4, 345-357.
- Betancourt-Galindo, R., Reyes-Rodriguez, P.Y., Puente-Urbina, B. A., Avila-Orta, C.A., Rodríguez-Fernández, O.S., Cadenas-Pliego, G., García-Cerda, L.A. (2014). Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *Journal of Nanomaterials*, 10.
- Brent, K.J., Hollomon, D.W. (1998). *Fungicide resistance: the assessment of risk* (pp. 1-48). Brussels, Belgium: Global Crop Protection Federation

- Brinker, F. (1993). *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush). *British Journal of Phytotherapy* 3:10-30.
- Burman, U., Saini, M., Kumar, P. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95: 605-612.
- Corrales Flores, J. (2014). Nanopartículas de Cobre y de óxido de Zinc como antifúngico contra *Botrytis Cinérea* In Vitro E In Vivo en frutos de tomate durante pos cosecha. Tesis de licenciatura especializada en Parasitología. Universidad Autónoma Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 14-17pp
- Cardona, C.; Rendón, F.; Garcia, J.; López-Ávila, A.; Bueno, J.; Ramírez, J. (2001). Resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporarioru* (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología* 27: 33-38.
- Cardona, C.; Rendón, F.; Rodríguez, I.; López-Ávila, A. (2005). Whiteflies as pests of annual crops in the tropical highlands of Latin America: Insecticide resistance in Colombia and Ecuador. pp. 285-293. In: Anderson, P.; Morales, F. (Eds.). *Whitefly and Whitefly-Borne Viruses in the Tropics: Building a Knowledge Base for Global Action*. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali. Colombia. 351 p.
- Castrillón Rivera, L.E., Palma Ramos, A. (2014). Actividad antimicótica de nanopartículas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 7(12).
- Correll, D.S., Johnston, M.C. (1970). *Manual of the vascular plants of Texas*. Texas Research Foundation. Renner, Texas
- Comisión Europea, (2011) Recomendación de la Comisión de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial. Link: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696#ntr6-L_2011275ES.01003801-E0006 (Fecha de consulta 14/5/2018)

- Coyle, J., Roberts, N.C. (1975). A Field Guide to the Common and Interesting Plants of Baja California. Natural History Publisher Company. La Joya, California, USA. 43 p.
- Das, P., Barua, S., Sarkar, S., Karak, N., Bhattacharyya, P., Raza, N., Bhattacharya, S.S. (2018). Plant extract-mediated green silver nanoparticles: Efficacy as soil conditioner and plant growth promoter. *Journal of hazardous materials*, 346, 62-72.
- Davis, M.J., Gillaspie, Jr. A.G., Vidaver, A.K., Harris, R.W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic *Coryneform bacteria*, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov.; subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. Pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int J Syst Bacteriol*, 34,107-117.
- Dillard H, D. Cole, T. Hedges, A. Turner, D. Utete, B. Mvere, Agubba and P. Wilkinson. 1995. Early Blight of Tomatoes. Zimbabwe. Horticultural Crops Pest management. NYSAES, Geneva NY. 2 pp.
- De León, L., Rodriguez, A., Lopez, M.M., Siverio, F. (2008). Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Journal of applied microbiology*, 104, 776-786.
- De Oliveira, Jhones Luiz. (2014). Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. *Biotechnology advances*, 32, 1550-1561.
- Delegado, R. nº 1363/2013 de la Comisión, de 12 de diciembre de 2013, por el que se modifica el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, en lo relativo a la definición de "nanomaterial artificial".
- Delgado-Ortiz, J.C., Ochoa-Fuentes, Y.M., Cerna-Chávez, E., Beltrán-Beache, M., Rodríguez-Guerra, R., Aguirre-Urbe, L.A., Vázquez-Martínez, O. (2016). Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. *Revista argentina de microbiología*, 48, 222-228.

- Dimkpa, C.O., McLean, J.E., David, W., Britt, D.W., Anderson, A.J. (2015). Nano CuO and interaction with nano-ZnO or soil bacterium provide evidence for the interference of nanoparticles in metal nutrition of plants. *Ecotoxicology*. 24: 119-129.
- Domenech Gordillo, F.N. (2017). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de *Ambrosia arborescens* (marco) como reductor químico (Bachelor's thesis, PUCE).
- Downum, K.R., Dole, J., Rodríguez, E. (1988). Nordihydroguaiaretic acid: inter- and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 16,551-555.
- Duisberg, P.C. 1952. Development of a feed from the creosote bush and the determination of its nutritive value. *Journal of Animal Science* 11:174-180.
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M.B., Seabra, A.B., Fávaro, W.J., Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12, 789-799.
- EFSA Scientific Committee. (2011). Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal*, 9(5).
- Eichenlaub, R., Gatermann, K.H., Burger, A. (2006). *Clavibacter michiganensis*, a group gram-positive phytopathogenic bacteria. En: *Plant-Associated Bacteria*. Ed: S.S. Gnanamanickam. 385-421 p.
- Esparza Rivera, E.L. (2015). Actividad antimicrobial de nanopartículas de cobre y óxido de zinc contra hongos y bacterias Fitopatógenas.
- Espinosa, C. (2004). Memorias del IV simposio nacional de horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción. Torreón, Coah. México. Octubre, 13, 14.
- Espinoza, V., Fabián, N. (2014). El uso de plaguicidas químicos en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), su relación con el medio ambiente y la salud (Bachelor's thesis).

- Fang, J., Lyon, D.Y., Wiesner, M.R., Dong, J., Alvarez, M. (2007). Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Sci Tot Environ* 41, 2636–2642.
- FAO/WHO, (2010). Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications. Meeting report. Rome 2010.
- Félix, G. R. (1993). Control de Tizón tardío *Phytophthora infestans* en tomate industrial considerando la influencia de algunos factores ambientales para el uso de fungicidas. Memorias XX Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad mexicana de Fitopatología. Resumen 31-31 pp.
- Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I.E., Espinoza-Mancillas, M.G., Leyva-López, N.E., Martínez-Valenzuela, C., Martínez-Álvarez, J.C., Herrera-Rodríguez, G. (2012). Halo-spot and external stem necrosis of tomato caused by *Pseudomonas syringae* in Sinaloa, Mexico. *Phytoparasitica*, 40, 403–412.
- Fernández, S., Hurtado, L.M., Hernández, F. (1979). Fungicidal components of creosote bush resin. pp. 351-355. In: *Advances in Pesticide Science* (ed. H. Geissbühler). Pergamon Press Oxford and New York.
- FIRA. (2016). Panorama agroalimentario, Revista. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial, 2-5pp. Disponible en: https://documentop.com/queue/tomate-rojo-2017-fira_5a03abc51723dd8174ee4963.html (Fecha de consulta 8/02/18)
- Foltête, A.S., Masfaraud, J.F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C., Cotelle, S. (2011). Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution*, 159, 2515-2522.
- Fúnez, A.Á., Duaso, A.I.H., Gómez, P.M. (2016). Nanotecnología en la industria alimentaria: aplicaciones/nanotechnology in the food industry: applications. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10, 1.

- Gajewicz, A., Rasulev, B., Dinadayalane, T.C., Urbaszek, P., Puzyn, T., Leszczynska, D., Leszczynski, J. (2012). Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: Application of computational approaches. En *Adv Drug Deliv Rev.* 64,1663-1693.
- García, A.C. (2016). La propuesta de Reglamento de nuevos alimentos: ¿preparados para comer insectos, carne cultivada en laboratorio, sustancias usadas en complementos alimenticios o nanomateriales?. *Revista CESCO de Derecho de Consumo*, 16, 119-130.
- Gardea-Torresdey, J., Parsons, J., Peralta-Videa, J., Gomez, E., Jose-Yacaman, M. (2003). U.S. Patent Application No. 10/732,927.
- Gehrke, P.J. (2017). *Nano-Publics: Communicating Nanotechnology Applications, Risks, and Regulations*. Springer.
- Gleason, M.L., Gitaitis, R.D., Ricker, M.D.. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Dis.* 77,1069-1076.
- Gómez, J.R.; Hernández, F.L.M.; Cossio, V.L.E., López, A.J.G., Sánchez, L.R. (2011). Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico Núm. 19, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México.
- Gómez, G.L. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad*, 2, 18-22.
- González, Ivonne, Yailén, Arias, Peteira, Belkis. (2012). ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*-TOMATE. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7. Recuperado en 28 de diciembre de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000100001&lng=es&tlng=es
- Gonzalez-Coloma, A., Wisdom, Ch.S., and Rundel, P.W. (1988). Ozone impact on the antioxidant nordihydroguaiaretic acid content in the external leaf resin of *Larrea tridentata*. *Biochemical Systematics and Ecology* 16:59-64.

- Gubbins, E.J., Batty, L.C., Lead, J.R. (2011). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*, 159, 1551-1559.
- Gulrajani, M., Gupta, D., Periyasamy, S., Muthu, S. (2008). Preparation and application of silver nanoparticles on silk for imparting antimicrobial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 108, 614-623.
- Hartemann, P., Hoet, P., Proykova, A., Fernandes, T., Baun, A., De Jong, W., Wijnhoven, S. (2015). Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. *Materials Today*, 18, pp.122-123.
- Hernández-Pinero, J.L., Terrón-Rebolledo, M., Foughbakhch, R., Moreno-Limón, S., Melendrez, M.F., Solís-Pomar, F., Pérez-Tijerina, E. (2016). Effect of heating rate and plant species on the size and uniformity of silver nanoparticles synthesized using aromatic plant extracts. *Applied Nanoscience*, 6, 1183-1190.
- Hurtado, J.M.I. (2014). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por el método de reducción química: optimización del método.
- Hyder, P.W., Fredrickson, E.L., Estell, R.E., Tellez, M., Gibbens, R.P. (2002). Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosotebush (*Larrea tridentata*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 905-912.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (Eds.), *The Fusarium laboratory manual* (11st edition), Blackwell Publishing, Iowa (2006) 388-12.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., Eichenlaub, R. (1999). Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ Microbiol.*, 1, 113-118.
- Jaiswal, S., Mishra, P. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity of curcumin-silver nanoparticles with improved stability and selective toxicity to bacteria over mammalian cells. *Medical microbiology and immunology*, 207, 39-53.
- Jin, T., Sun, D., Su, J. Y., Zhang, H., Sue, H.J. (2009). Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food science*, 74(1).

- Jo, Y. K., Kim, B.H., Jung, G. (2009). Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, 93, 1037-1043. ‘
- Jones, J.B., Paul, J., Stall, R.E., Zitter T.A. (2001). *Plagas y Enfermedades del Tomate*. APS. España. 74.
- Khan, S., Alam, F., Azam, A., Khan, A. (2012). “Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm”. *Int J Nanomedicine* 7: 3245- 3257.
- Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, Y.S., Min, J.S., Lee, Y.S. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40, 53-58.
- Kim, S.W., Kim, K.S., Lamsal, K., Kim, Y.J., Kim, S.B., Jung, M., Lee, Y.S. (2009). An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *J Microbiol Biotechnol*, 19, 760-764.
- Kiehr, M., R. Delhey, 2005. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano- XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Argentina pp. Hv13
- Krishnaraj, C., Ji, B.J., Harper, S L., Yun, S.I. (2016). Plant extract-mediated biogenic synthesis of silver, manganese dioxide, silver-doped manganese dioxide nanoparticles and their antibacterial activity against food-and water-borne pathogens. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39, 759-772.
- Lara, H., Garza-Treviño, E., Ixtepan-Turrent, L., Singh, D. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), p.30.
- Le, A.T., Tam, L.T., Tam, P.D., Huy, P.T., Huy, T.Q., Hieu, N.V. (2010). Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. *Mater Sci Eng C*; 30: 910-916.
- León-Gallegos, H.M. (1988). *Enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa*. 3rd ed. INIFAP. Sinaloa, México: CAUVACU-CIAPAN Culiacán.

- Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L., Zhang, Q. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chemistry*, 9(8), 852-858.
- Lira Saldívar, R. H. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (DC) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2).
- Logeswari, P., Silambarasan, S., Abraham, J. (2013). Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica*, 20, 1049-1054.
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H., Tam, P., Chiu, J., Che, C. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res* 5: 916–924.
- Mabry, T.J., DiFeo, D.R.Jr., Sakakibara, M., Bohnstedt, C.F., and Siegler, D. (1977). Biology and chemistry of *Larrea*. pp. 115-134. In: T.J. Mabry, J.H. Hunziker, D.R.Jr. DiFeo (eds.). *Creosote Bush Bush-Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts*. US/IBP Synthesis Series 6. Dowden, Hutchinson and Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA.
- Malabadi, R.B., Chalannavar, R.K., Meti, N.T., Mulgund, G.S., Nataraja, K., Kumar, S.V. (2015). Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus cultures and in vitro derived plants of *Catharanthus roseus*. *Research in Pharmacy*, 2(6).
- Mangematin, V., Walsh, S. (2012). The future of nanotechnologies.
- Matson, P.A., W.J. Parton, A.G. Power, M.J. Swift, (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Sci.*, 25. 277: 504-509.
- Medina-Ríos, M. (2011). “Inducción de Resistencia a *Fusarium oxysporum* y Estimulación del Desarrollo Vegetal en Jitomate (*Solanum lycopersicon*) Empleando *Methylobacterium spp.*” Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIRIPN-MICHOACÁN. Jiquilpan, Michoacán, México. 69 pp.

- Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I., Mendoza-Mendoza, E., García-Cerda, L.A., Puente-Urbina, B.A., Lira-Saldívar, R.H. (2016). Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annuum* por nanopartículas de óxido de zinc. *Nova Scientia*, 8(17).
- Mendoza Uribe, G., Rodríguez-López, J.L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles latinoamericanos*, 15, 161-186.
- Michelse, C. Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10,311–324.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31, 346-356.
- Momol, T. and K. Pernezny. (2006). Florida Plant Disease Management Guide: Tomato. Publication PDMG-V3-53. Florida Cooperative
- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química*. 105, 33-41.
- Mubayi, A., Chatterji, S., Rai, P., Watal, G. (2012). Evidence bases green synthesis of nanoparticles. *Advanced Materials Letters*, 3,519-525.
- Mukunthan, K.S., Balaji, S. (2012). Cashew apple juice (*Anacardium occidentale L.*) speeds up the synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Green Nanotechnology*, 4, 71-79.
- Naderi, M. R., Danesh-Shahraki, A. (2013). Nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5, 2229.
- Nagati, V. B., Nallagouni, C. S. R., Koyyati, R., Manthurpadigya. (2018). Eco-friendly synthesis and characterization of silver nanoparticles from putative medicinal plant *Annona reticulata*.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A.J., Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 372-386.

- Neal, A. (2008). "What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?". *Ecotoxicology* 17: 362-371.
- Nemati, Z., Alonso, J., Rodrigo, I., Das, R., Garaio, E., Garcia, J.A., Srikanth, H. (2018). Improving the Heating Efficiency of Iron Oxide Nanoparticles by Tuning Their Shape and Size. *The Journal of Physical Chemistry C*.
- Nuez, F. A., Rodríguez, J., Tello, J. Cuartero, B. Segura. (1995). *El cultivo del tomate*. Editorial Mundi Prensa. España. 125 p.
- Oldenburg, S. (N/D). Silver Nanoparticles: Properties and Applications. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>, 24 de julio de 2016.
- Orberá, R. T. M, Serrat, D. M. Gonzáles, G. Z. (2009). Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13:95-100.
- Ortega, M.L.D. (2010). Efecto de los sustratos en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 129 p.
- Ouahid Hessissen, A. (2016). Nanotecnología y sus potenciales aplicaciones en microbiología.
- Pal, S., Tak, Y. Song, J. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73,1712-1720.
- Palanikumar, L., Ramasamy, S. N., Balachandran, C. (2014). Size-dependent antimicrobial response of zinc oxide nanoparticles. *IET nanobiotechnology*, 8, 111-117.
- Pandey, A. C., S. Sanjay, S., S. Yadav, R. (2010). Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental nanoscience*, 5(6), 488-497.

- Pandey, A.C., Sanjay, S.S., Yadav, R.S. (2010). Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental nanoscience*. 5:488-97.
- Panwar, J., Jain, N., Bhargaya, A., Akhtar, M.S., Yun, Y.S. (2012). Positive effect of zinc oxide nanoparticles on tomato plants: A step towards developing nano-fertilizers. *International Conference on Environmental Research and Technology (ICERT)*. Malaysia. 8 pp.
- Park, Y. H., Suzuki, K., Lee, K. C., Yoon, J., Kim, S., Kho, Y. H., Goodfellow, M., y Komagata, K. (1993). Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 64,307-313.
- Perlatti, B., Fernandes, J. B., Forim, M. R. (2012). Validation and application of HPLC–ESI-MS/MS method for the quantification of RBBR decolorization, a model for highly toxic molecules, using several fungi strains. *Bioresource technology*, 124, 37-44.
- Prasad, T.N., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K.R., Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*. 35: 905-927.
- Prasad, R., Kumar, V., Prasad, K. S. (2014). Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology*, 13, 705-713.
- Puurunen, K., Vasara, P. (2007). Opportunities for utilising nanotechnology in reaching near-zero emissions in the paper industry. *Journal of Cleaner Production*, 15, 1287-1294.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27,76-83.
- Ren, L., Huang, X. L., Zhang, B., Sun, L. P., Zhang, Q. Q., Tan, M. C., Chow, G. M. (2008). Cisplatin-loaded Au–Au₂S nanoparticles for potential cancer therapy: Cytotoxicity, in vitro carcinogenicity, and cellular uptake. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85, 787-796.

- Rezaei, M. y Abbasi, H. (2014). Foliar application of nanochelate and non-nanochelate of zinc on plant resistance physiological processes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Iranian Journal of Plant Physiology. 4: 1137-1144.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). Nanoscale research letters, 8(1), 318.
- Romero García, A. L. (2011). Control biológico de *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis.
- Rueda A., Shelton A. M. (1996). Tizón Temprano del Tomate. Cornell International Institute for Food, Agriculture and Development. Global Crop Pests. Disponible en <http://web.entomology.cornell.edu/shelton/veg-insects-global/spanish/eblight.html> (Fecha de consulta 8/02/18)
- Rundel, P.W., Sharifi, M.R., and González-Coloma, A. (1994). Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata*. pp. 105-114. In: M. Arianoustsou and R.H. Groves (eds.). Plant-Animal Interactions in Mediterranean-Type Ecosystems. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta biomaterialia, 4, 707-716.
- Russell, S. J., Peng, K. W., Bell, J.C.(2012). Oncolytic virotherapy. Nature biotechnology, 30, 658-670.
- S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song.(2007).Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram negative bacteria Escherichia coli, Appl. Environ. Microb. 73 (6) 1712e1720.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), (2010). Monografía de cultivos "Jitomate", Subsecretaría de Fomento a los agronegocios. 10 p. Disponible en línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf> (Fecha de consulta 8/02/18)

- SAGARPA. La exportación de jitomate mexicano genera ingresos por mil 200 mdd anuales. De: sagarpa. gov.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2010-B133.aspx. (Fecha de consulta 8/02/18)
- Sakakibara, M., DiFeo, D.Jr., Nakatani, N., Timmerman, B., Mabry, T.J. (1976). Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. *Phytochemistry* ,15,727-731.
- Salama, H.M. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) and corn (*Zea mays L.*). *International Research Journal of Biotechnology*, 3,190-197
- Sapkota, B., Sharma, G., Lamichhane, G., Adhikari, M. (2018). A Review on: Green Synthesis of Silver Nano-Particle Using Fruits Extract. *Advanced Science Letters*, 24, 817-820.
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S. W., Cho, C. W., Kim, S., Yun, Y. S. (2009). Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 332-338.
- Savithamma, N., Ankanna, S., Bhumi, G. (2012). Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* an endemic and endangered medicinal tree taxon. *Nano Vision*, 2, 2.
- Seigler, D.S., Jakupcak, J., Mabry, T.J. (1974). Wax esters from *Larrea divaricata*. *Phytochemistry* 13:983-986.
- Sharma, P., Deepesh, B., Zaidi, M. G., Pardha, P., Khanna, P. K., Sandeep, A. (2012). Silver Nanoparticle-Mediated Enhancement in Growth and Antioxidant Status of *Brassica juncea*. *Appl Biochem Biotechnol*. 167:2225–2233.
- Shreve, F., Wiggins, I.L. (1964). *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert*. Vol. II. Stanford University Press. Stanford, California, USA. 75 p.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18:1-9.

- Shyla, K.K., Natarajan, N. (2014). Customizing zinc oxide, silver and titanium dioxide nanoparticles for enhancing groundnut seed quality. *Indian Journal of Science and Technology*, 7: 1376-1381.
- Siddiqui, H.M., Al-Whaibi, H., M., Mohammad, F. (Editors). (2015). *Nanotechnology and Plant Sciences. Nanoparticles and Their Impact on Plants*. Springer International Publishing Switzerland. ISBN 978-3-319-14502-0 (eBook). 305 pp.
- Sozer, N., Kokini, J.L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in biotechnology*, 27, 82-89.
- Thangavelu, R. M., Gunasekaran, D., Jesse, M. I., SU, M. R., Sundarajan, D., & Krishnan, K. (2016). Nanobiotechnology approach using plant rooting hormone synthesized silver nanoparticle as “nanobullets” for the dynamic applications in horticulture—An in vitro and ex vitro study. *Arabian Journal of Chemistry*.
- The Royal Society and The Royal Academy of Engineering Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. (2004). London, UK The Royal Society and The Royal Academy of Engineering
- Torres, T. (2002). Nanoquímica y Nanotecnología: Nuevos materiales, polímeros y máquinas moleculares. *Encuentros multidisciplinares*, 4(12)., pp. 20-25
- Tran, Q., Nguyen, V., Le, A. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4, 033001.
- Tippayawat, P., Phromviyo, N., Boueroy, P., & Chompoosor, A. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*, 4, e2589.
- Trepiana Fica, D. (2015). Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans*. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/13195>
- Turlier MF, Epavier A, Alabouvette C. (1994) Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* and the roots of *Linus usitatissimum* as revealed by transgenic *GUS*-marked hyphae. *Can J Bot.*; 72, 1605-1612.

- UC Statewide IPM Program. (2009). Pest management guidelines: tomato. University of California, Davis.
- UNL, Departamento de Química General e Inorgánica - Cátedra de Química General. Guía de Trabajos Prácticos 2013 Disponible en: <http://www.fccb.unl.edu.ar/inorganica/tp%20precipitacion.pdf>
- Valencia, G.A.; Vercik, L.C.O.; Ferrari, R.; Vercik, A. (2013). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using water-soluble starch and its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*. *Starch/Stärke*. 11-12, 931-937.
- Valle, R.V., Aguilar, M.M.M. (2004). Características Vegetativas y Susceptibilidad de Variedades de Ajo (*Allium sativum* L.) Infechadas por *Fusarium spp.* *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 435-438.
- Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis Muñoz, M. I. Alcocer Silva, M., Gual-Díaz; C. Sánchez Dirzo. (1999). Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO - Instituto de Ecología, UNAM. (Fecha de consulta 24 de diciembre del 2017) http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf
- Velásquez, M.J.L. (1983). Evaluación del poder bactericida o bacteriostático de la fracción etanólica de la resina de gobernadora contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *E. atroseptica* y *Pseudomonas solanacearum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 57 p.
- Verástegui, M.A., Sánchez, C.A., Heredia, N.L., and García-Alvarado, J.S. (1996). Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *Journal of Ethnopharmacology* 52:175-177.
- Verma, A. y Mehata, M. (2016). Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 109-115.

- Vijayakumar, M., Priya, K., Nancy, F. T., Noorlidah, A., Ahmed, A.B.A. (2013). Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products*, 41, 235-240.
- Villaseñor R., J. L., F. J. Espinosa G., (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Yamamoto, O. (2001). Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3, 643-646.
- Yah, C. S., Simate, G. S. (2015). Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 43.
- Young-Ki, J., Byung, H.K. (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, 93, 1037.
- Zanella R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño, *Mundo Nano*, artículos: Vol. 5, No. 1.
- Zhang, W., Qiao, X., Chen, J. (2008). Formation of silver nanoparticles in SDS inverse microemulsions. *Materials chemistry and physics*, 109, 411-416.
- Zhao, L., Sun, Y., Hernandez, V.J., Servin, A.D., Hong, J.; Niu, G., Peralta, V.J., Duarte, G.M., Gardea, T.J. (2014). Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: A Life Cycle Study. *Journal of agricultural and food chemistry*. 61: 11945-11951.
- Figura de Escala nanométrica Link: https://1.bp.blogspot.com/-egnmyh_CeS8/V_eWRwjJXOI/AAAAAAAAHHA/ynoWzjeaWNQ8XIN7AzDo3ITiWQmEdPfnwCLcB/s1600/escala%2Bnanometrica.jpg.