



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS

Evaluación del efecto biocida de nanopartículas de plata a partir de papa
(*Solanum tuberosum*) sobre *Colletotrichum* spp con prospectiva en post
cosecha

AUTOR

CARLA DENNISE ALVEAR ACOSTA

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS

Evaluación del efecto biocida de nanopartículas de plata a partir de
papa (*Solanum tuberosum*) sobre *Colletotrichum spp* con prospectiva en post
cosecha

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y Alimentos

Profesor Guía

Msc. Bolivar Edmundo Silva López

Autora

Carla Dennise Alvear Acosta

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación del efecto biocida de nanopartículas de plata a partir de papa (*Solanum tuberosum*) sobre *Colletotrichum spp.* con prospectiva en post cosecha, a través de reuniones periódicas con el estudiante Carla Dennise Alvear Acosta, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Bolívar Edmundo Silva López

Magister en Gestión de la Producción

C.I.: 1706480694

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación del efecto biocida de nanopartículas de plata a partir de papa (*Solanum tuberosum*) sobre *Colletotrichum spp.* con prospectiva en post cosecha, del Carla Dennise Alvear Acosta, en el semestre 201910 dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación

Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Doctor en Ingeniería Industrial PhD

C.I.: 1706515564

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Carla Dennise Alvear Acosta

C.I. 1720503927

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres quienes me dieron la oportunidad de estudiar, a mi padre por ser mi ejemplo de constancia y dedicación a mi madre por ser mi fortaleza.

A todos mis profesores que con mucho empeño pudieron transmitirme sus conocimientos durante toda mi carrera Universitaria, especialmente a mi profesor guía Msc. Bolívar Silva por toda su paciencia y ayuda en el desarrollo de esta investigación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP- sede Tumbaco especialmente a la Ing. Andrea Sotomayor y al Ing William Viera quienes me abrieron las puertas para poder desarrollar una parte esencial de mi trabajo de titulación.

DEDICATORIA

Con especial cariño dedico este trabajo a la Santísima Virgen Inmaculada, gracias por siempre bendecirme, guiarme y cuidarme.

A mis padres Carlos y Aida, gracias por el gran amor y soporte que me han brindado en toda mi vida, gracias porque me enseñaron a ser valiente y nunca rendirme, estoy eternamente agradecida.

A mi hermana Daya por su apoyo amor y compañía. Gracias por siempre estar a mi lado y ser mi gran amiga.

Finalmente dedico mi trabajo a Pochi, mi gata. Por su compañía y alegría en toda mi carrera universitaria.

RESUMEN

Cuando las partículas de un cuerpo tienen el orden del nanómetro o a su vez de una milésima de micra son llamadas nanopartículas; las nanopartículas de plata tienen un gran interés debido a su efecto biocida, en el campo de la agricultura existen enfermedades como la antracnosis enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum*, se la puede ver presente en frutos, hojas y tallos de la planta hospedera. Ataca a varios cultivos como solanáceas, cereales, leguminosas, cítricos y hortalizas. La finalidad de esta investigación fue analizar el efecto biocida de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de soluciones de papa y nitrato de plata para controlar infecciones causadas por *Colletotrichum spp.* Para esto se recolectó frutos de tomate de árbol que mostraban la presencia de la enfermedad, se aisló, se purificó y se identificó el hongo *Colletotrichum spp.*, a su vez se sintetizó nueve soluciones de nanopartículas de plata por medio del método de Síntesis verde, cada una de ellas con diferente concentración de papa y de nitrato de plata. Seguido, las nueve soluciones fueron puestas en cajas Petri junto con PDA más cloranfenicol, y a continuación se sembró el hongo ya identificado; se obtuvo datos del diámetro de crecimiento del hongo de cada una de las cajas Petri a los 7 días de incubación con los datos obtenidos se desarrolló el cálculo del índice antifúngico, para el análisis de en la investigación se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones y un análisis funcional con Tukey (Pruebas de separación de medias) al 5%. Las variables que se evaluaron fueron Diámetro de Crecimiento (mm) del hongo y el Índice Anti fúngico (%). La muestra de *Colletotrichum spp.* que tuvo un menor diámetro de crecimiento fue la muestra sembrada en agar PDA + cloranfenicol+ solución 2.2 (24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ+ 5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada)), la misma muestra tuvo el mayor índice anti fúngico. Esta solución fue considerada con mayor resistencia de crecimiento fúngico. Por otro lado, las pruebas realizadas con las otras soluciones colocadas en Agar PDA + Cloranfenicol se las considera soluciones con el menor índice antifúngico y con diámetro de crecimiento del hongo más grandes.

Palabras claves: antracnosis, efecto biocida, nanopartículas de plata.

ABSTRACT

When the particles of a body have the order of a nanometer or a thousandth of a micron, they are called nanoparticles; silver nanoparticles are of great interest due to their biocidal effect, in the field of agriculture there are diseases such as the anthracnose disease caused by the fungus *Colletotrichum*, it can be seen present in fruits, leaves and stems of the host plant. Attacks several crops such as Solanaceae, cereals, legumes, citrus fruits and vegetables. The purpose of this research was to analyze the biocidal effect of silver nanoparticles synthesized from potato and silver nitrate solutions to control infections caused by *Colletotrichum* spp. For this, tree tomato fruits were collected that showed the presence of the disease, the fungus *Colletotrichum* spp. Was isolated, purified and identified. In turn, nine silver nanoparticle solutions were synthesized using the Green Synthesis method, each one of them with different concentration of potato and silver nitrate. Then, the nine solutions were placed in Petri dishes together with PDA plus chloramphenicol, and then the already identified fungus was seeded; data of the fungal growth diameter of each one of the Petri dishes was obtained after 7 days of incubation with the data obtained, the calculation of the antifungal index was developed, for the analysis of the research a completely randomized design was applied (DCA) with three repetitions and a functional analysis with Tukey (Tests of separation of means) to 5%. The variables that were evaluated were Diameter of Growth (mm) of the fungus and the Anti-fungal Index (%). The sample of *Colletotrichum* spp that had a smaller growth diameter was the sample seeded in PDA agar + chloramphenicol + solution 2.2 (24 mg of silver nitrate in 50 ml of milliQ water + 5 ml of (15g of potato in 100 ml of distilled water)), the same sample had the highest anti fungal index. This solution was considered with greater fungal growth resistance. On the other hand, the tests carried out with the other solutions placed on Agar PDA + Chloramphenicol are considered solutions with the lowest antifungal index and with the largest growth diameter of the fungus.

Keywords: anthracnose, biocidal effect, silver nanoparticles.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. ANTECEDENTES.....	2
1.2 JUSTIFICACION.....	3
1.3. ALCANCE.....	4
1.4. OBJETIVOS.....	4
1.4.1. Objetivo General	4
1.4.2. Objetivos específicos	4
2. MARCO TEORICO	5
2.1. Nanoparticulas	5
2.2. Nanoparticulas de plata.	6
2.3. Efecto biocida	6
2.4. Síntesis de nanoparticulas.....	7
2.4.1 Métodos químicos.....	7
2.4.2. Métodos físicos.....	9
2.4.3. Método biológico.....	9
2.5 Métodos de identificación de nanoparticulas	9
2.5.1 Espectroscopia Uv-vis	9
2.5.2 Microscopia Electronica De Transmision (Met).....	10
2.5.3. Espectroscopia Raman.....	10
2.5.4. Espectroscopia de infrarrojo	10
2.6. Toxicidad de las nanoparticulas de plata.....	10
2.6.1. Vía oral	11
2.6.2. Vía respiratoria	11
2.6.3. Vía dérmica.....	11

2.6.4. Toxicidad	12
2.7. Descomposición de alimentos por microorganismos.....	12
2.8. Hongos.....	13
2.9. Clasificación taxonómica <i>Colletotrichum spp.</i>	13
2.10. Antracnosis	13
2.11. Sintomatología	14
2.12. Diseminación	15
2.13. Identificación de las especies <i>Colletotrichum spp.</i>	16
2.13.1. <i>Colletotrichum acutatum</i>	16
2.13.2. <i>Colletotrichum capsici</i>	16
2.13.3. <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	16
2.13.4. <i>Colletotrichum coccodes</i>	16
2.14. Protocolo para aislamiento de <i>Colletotrichum</i>	17
2.14.1. Recolección de material vegetal	17
2.14.2. Aislamiento y purificación	17
2.14.3. Identificación	17
2.15. Cultivo de tomate de árbol	17
3 MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS	18
3.1. Materiales	18
3.1.1 Materiales de Laboratorio	18
3.1.2. Equipos.....	19
3.1.3. Materia prima.....	19
3.2. MÉTODOS	20
3.2.1. Ubicación del experimento.....	20
3.2.2. Estadística	20
3.2.3. Variables.....	22
3.3.3. Manejo del experimento.....	23

3.3.3.1. Preparación extracto de papa	23
3.3.3.2. Síntesis de nanoparticulas de plata	24
3.3.3.3. Evaluación de la presencia de nanoparticulas de plata en las diferentes soluciones	25
3.3.3.4. Recolección del material vegetal	26
3.3.3.5. Aislamiento	26
3.3.3.6. Purificación	27
3.3.3.7. Identificación	27
3.3.3.8. Evaluación de la actividad antifungica	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Síntesis de nanoparticulas de plata	29
4.2. Evaluación de la presencia de nanoparticulas de plata en las diferentes soluciones.....	30
4.3. Identificación del hongo	33
4.4. Evaluación de la actividad antifungica	35
4.5. Diseño experimental	38
4.5.1. Diámetro de crecimiento del hongo <i>Colletotrichum</i>	39
4.5.2 Índice Antifúngico.....	41
5. DISCUSION	43
5.1. Síntesis de nanoparticulas de plata.....	43
5.2. Evaluación de la presencia de nanoparticulas de plata en las diferentes soluciones.....	43
5.3. Evaluación de la actividad antifúngica	44
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
6.1. Conclusiones	46
6.2. Recomendaciones	47

REFERENCIAS	48
-------------------	----

1. INTRODUCCION

Las nanotecnologías son un conjunto de técnicas para manipular materia a escala molecular. Actualmente la importancia se enfoca en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de materia que se encuentra entre 1 a 100 nanómetros, la palabra “nano” en griego hace referencia a algo extremadamente pequeño (Foladori, 2016). En los últimos años se ha dado gran importancia a las nanotecnologías debido a sus aplicaciones y ha permitido desarrollar grandes avances científicos en varias áreas.(Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009).

Uno de los metales que ha llamado la atención de varios científicos es la plata, por su efecto biocida. A lo largo de la historia se conoce que se utilizaba la plata como medicina, joyería y para conservar alimentos.(Avalos, Haza, y Morales, 2013)

Actualmente las nanopartículas de plata ejercen funciones muy importantes en varios campos como por ejemplo: en medicina se utilizan para el control de infecciones y tratamientos de heridas graves, dispositivos anticonceptivos y en recubrimientos de material quirúrgico. En la industria alimentaria se utilizan nanopartículas de plata para alargar la vida útil de frutas y verduras, además en la actualidad existen materiales de contacto directo con el alimento elaborados con nanopartículas de plata y este elimina hasta un 90% el crecimiento de microorganismos dando una nueva alternativa para métodos de conservación(Ledezma A., Romero J., Hernández M., Moggio I., Arias E., 2014). Tomando en cuenta que en la vida diaria todos los seres humanos tenemos contacto con nanopartículas de plata contenidas en aerosoles, detergentes y cosméticos nos damos cuenta de la importancia que abarca las nanopartículas de plata en nuestro diario vivir .(Avalos et al., 2013).

Se conoce que alrededor de un tercio de alimentos destinados para consumo humano se descomponen por factores químicos, físicos o biológicos. Los golpes o cortes en frutas y verduras producen deterioro y si existe proliferación

de microorganismos se producirán cambios de textura, coloración, y olor característico a podredumbre (González, Tarón, y Pérez, 2017). *Colletotrichum* es un hongo que puede atacar a varios cultivos como solanáceas, cereales, leguminosas, cítricos y hortalizas. La enfermedad producida por *Colletotrichum* es Antracnosis y se la puede identificar por formación de hoyuelos negros, manchas y hundimientos circulares. Normalmente sus esporas son de color gris o rosa. (Santacruz Delgado, 2013). Varios estudios detallan que en Ecuador la antracnosis ha causado pérdidas hasta del 100% del total de la producción en frutas como tomate de árbol, naranjilla y frutilla (Patiño, Hoyos, y Afanor, 2007)

1.1. ANTECEDENTES

Hablar de nanopartículas en la actualidad es un tema que capta la atención inmediatamente, el estudio y las investigaciones en nanopartículas se encuentran en un nivel muy alto de aceptabilidad, interés y atención.

Existen varios trabajos de investigación relacionados con la síntesis de nanopartículas, entre los que se pueden citar los siguientes.

“Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*)” realizado por Lukas Cardeño y Martha Londoño publicada en el 2014, desarrollan una evaluación de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de ajo por medio de la síntesis verde, utilizan varias soluciones para la síntesis obteniendo un cambio de coloración lo cual muestra la posible existencia de nanopartículas de plata, en la investigación se utiliza el espectrofotómetro UV-Visible para conocer la concentración de las nanopartículas de plata en cada una de las soluciones realizadas, teniendo los mejores resultados en el pico de absorbancia de 400 a 470 nm. En otro trabajo de investigación realizado por Miguel Ángel Aguilar Méndez en el 2009 titulado “Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*” utiliza una síntesis con una solución acuosa de gelatina con glucosa junto con una solución de 0.1M de AgNO_3 , utiliza espectroscopia UV-Visible para conocer la absorción de cada una de las

soluciones estudiadas y para conocer la dimensión de las nanopartículas utilizó un microscopio electrónico, Espectroscopia Raman e Infrarrojo (FTIR), Aisló *Colletotrichum gloesporioides* de papaya y realizó una evaluación in vitro de la actividad antifúngica, además realizó una evaluación de calidad de frutos obteniendo resultados positivos en la inhibición de proliferación fúngica.

1.2 JUSTIFICACION

La antracnosis es un trastorno causado por el hongo *Colletotrichum*, *Colletotrichum* ataca a cultivos como solanáceas, cereales, leguminosas, cítricos y hortalizas siendo el causante de pérdidas del 100% de la cosecha. (Santacruz Delgado, 2013). *Colletotrichum* es el hongo que mayor daño causa a la producción frutícola a nivel mundial esto se debe a la fuerza y al porcentaje de pérdida de producción, además de su difícil control químico, que incide negativamente en el medio ambiente y aumenta costos de producción. (Pinto Liliana, Tiaguaro Carla, 2012)

Actualmente el estudio de nanopartículas tiene un alto interés para la ciencia debido a que se conoce que las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las nanopartículas son diferentes a las que se puede obtener de un cuerpo de tamaño más grande con la misma conformación química y al conocer que las nanopartículas de plata tienen efecto biocida; se desea evaluar este efecto sobre el hongo *Colletotrichum*.

El presente estudio aportará información crucial desde la síntesis verde de nanopartículas de plata, aislamiento, purificación e identificación de *Colletotrichum* en tomate de árbol, y la inhibición de crecimiento del hongo por las nanopartículas de plata.

Toda esta información permitirá realizar varios estudios futuros con aplicaciones en agroindustria como son recubrimientos de frutas y verduras buscando que la vida útil de las frutas y verduras se alarguen; nano-empaques alimenticios como método de conservación y disminución de uso de conservantes en alimentos, buscando como beneficio brindar una nueva opción de conservación de alimentos.

1.3. ALCANCE

El desarrollo del presente trabajo de titulación abarca desde la síntesis verde de nanopartículas que consiste en hacer reaccionar soluciones de nitrato de plata de distinta concentración con extractos de papa buscando la creación de nanopartículas de plata, seguido de un análisis por espectrofotometría de todas las soluciones obtenidas para verificar la presencia de nanopartículas de plata. Se realizarán pruebas con *Colletotrichum spp in vitro*, para esto es necesario el aislamiento, purificación e identificación del hongo patógeno obtenido de frutos de tomate de árbol que mostraban la presencia de la enfermedad. Se colocará las nanopartículas de plata junto con el medio de cultivo y se realizará una siembra del hongo patógeno el cual ya fue aislado, purificado e identificado, buscando evaluar el efecto biocida de las nanopartículas de plata obteniendo como resultado el índice antifúngico. Esta investigación servirá de base para nuevos estudios en nanopartículas en el ámbito agroindustrial debido a que se podrá realizar investigaciones de recubrimientos en frutas verduras, fungicidas, diseño de envases, etc.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Analizar el efecto biocida de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de soluciones de papa y nitrato de plata para controlar infecciones causadas por *Colletotrichum spp.*

1.4.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de plata a partir de soluciones de diferente concentración de papa y nitrato de plata mediante el método de reducción química.
- Determinar la presencia de nanopartículas de plata en las soluciones utilizando el método de espectrofotometría.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de las nanopartículas de plata en *Colletotrichum spp.*

2. MARCO TEORICO

2.1. Nanopartículas

Cuando las partículas de un cuerpo tienen el orden del nanómetro o a su vez de una milésima de micra son llamadas nanopartículas, “Nano” es un prefijo que equivalente a “pequeño”. “Nano” se utiliza en el sistema internacional (S.I.) para hacer referencia al valor de 10^{-9} , la **figura 1. Indica la escala manométrica**. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las nanopartículas son diferentes a las que se puede obtener de un cuerpo de tamaño más grande con la misma conformación química. En la actualidad existen técnicas las cuales permiten sintetizar, caracterizar y manipular a este tipo de partículas. Es posible regular la estructura electrónica de las nanopartículas uniéndoles con moléculas diferentes, este enlace que se forma entre las nanopartículas y moléculas es importante debido a que va a permitir que las nanopartículas precipiten y además para que cada una se mantenga en unidad.(Grande, 2007)

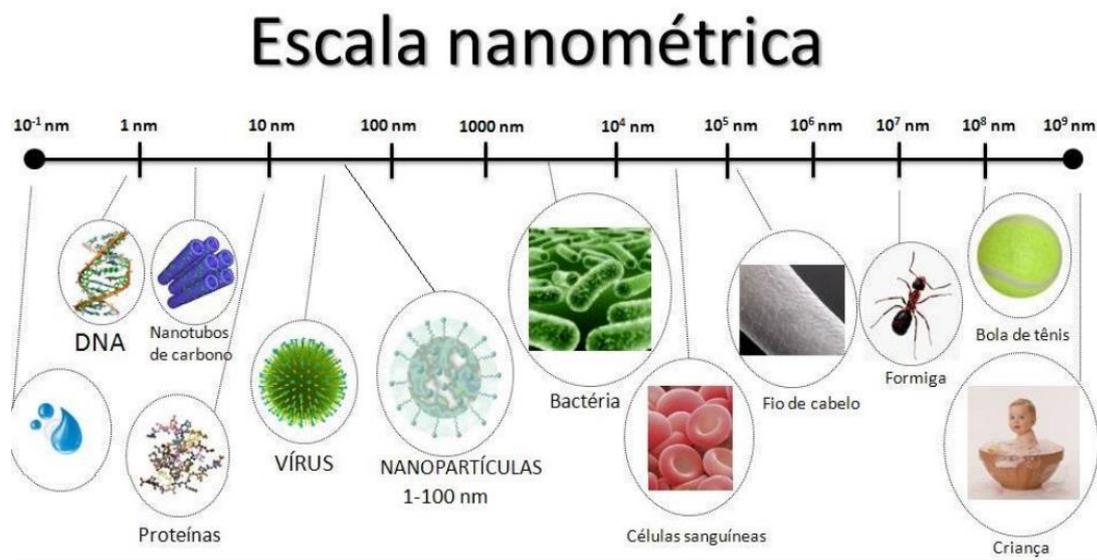


Figura 1. Escala comparativa de objetos en escala manométrica.

Tomado de: (Tahrioui & Hessissen, 2016)

2.2. Nanopartículas de plata.

La plata es uno de los metales más utilizados en la historia de la humanidad ya sea en joyería, medicina, etc. Se conoce que las civilizaciones griegas utilizaban plata para mantener el agua con seguridad y como medicina para curar quemaduras o lastimados, (Avalos, Haza, y Morales, 2013) en si la plata es una de las nanopartículas con mayor interés de estudio dentro del campo de la nanotecnología, esto se debe principalmente a sus propiedades antimicrobianas. Hoy en día las nanopartículas de plata tienen varias aplicaciones por su especial efecto biocida, las nanopartículas se están utilizando en medicina en el control de infecciones y tratamientos de heridas graves, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico, prótesis óseas estos tres últimos son recubiertos de nanopartículas de plata para que no exista crecimiento microbiano (Avalos et al., 2013). Además en la industria para recubrimiento de materiales textiles y finalmente para la industria alimentaria se utilizan nanopartículas de plata para alargar la vida útil de frutas y verduras, además en la actualidad existen materiales de contacto directo con el alimento realizado con nanopartículas de plata y este elimina hasta un 90% el crecimiento de microorganismos dando una nueva alternativa para métodos de conservación.(Ledezma A., Romero J., Hernández M., Moggio I., Arias E., 2014). En la vida diaria todos los seres humanos tenemos contacto con nanopartículas de plata contenidas en aerosoles, detergentes y cosméticos.(Avalos et al., 2013)

2.3. Efecto biocida

Existen varias teorías del efecto biocida encontrado en la plata, una de las teorías más nombradas señala que el enlace que forman los iones de plata con las moléculas de las paredes celulares de las bacterias, tienen la capacidad de desplazar elementos como el Ca y el Zn que son necesarios para la supervivencia de los microorganismos, ocasionando por ende la muerte de la bacteria. (Echavarría, Robledo, y Bejarano, 2017)

Otra investigación detalla que es posible que las nanopartículas de plata ataquen directamente al ADN de los microorganismos, haciendo que el ADN pierda su capacidad de réplica y por ende inhibiendo la proliferación de los microorganismos. (Pal, Tak, y Song, 2007).

Otra investigación detalla que las nanopartículas de plata inhiben las enzimas de la cadena respiratoria dificultando la formación de ATP terminando con la muerte del microorganismo. (Fúnez, Isabel, Duaso, y Morales Gómez, 2016).

En otra investigación se reportó que los iones de plata causan cambios en la estructura de la membrana celular de los microorganismos dañando completamente y directamente en las funciones propias de la membrana como son permeabilidad y respiración ocasionando la muerte del microorganismo. (Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009)

Se debe tomar en cuenta que características como la dimensión y la estructura las nanopartículas de plata influyen directamente en la capacidad biocida. Varias investigaciones detallan que entre más pequeña la nanopartícula mayor es la superficie de contacto consiguiendo un mayor efecto biocida. También se recalca que la capacidad biocida depende de la conglomeración de nanopartículas de plata y de la cantidad de microorganismos presentes (Pal et al., 2007)

2.4. Síntesis de nanopartículas

Uno de los aspectos más fundamentales en la síntesis de nanopartículas ya sea química, física o biológica es dar la estabilidad en sí de cada una de las nanopartículas, buscando que se mantenga en su forma, tamaño y sin perder su propiedad principal en el tiempo. (Zanella, 2012)

2.4.1 Métodos químicos

Los métodos químicos son los más empleados para la obtención de nanopartículas de plata, esto se debe al control que existe en el proceso de la síntesis, este control va a permitir obtener nanopartículas uniformes es decir con el mismo tamaño y forma para que tengan una propiedad conjunta

determinada.(Monge, 2014). En los métodos químicos tenemos el método de síntesis por reducción de sales de plata, en este método se ocupan compuestos como el borohidruro de sodio (NaBH_4), hidracina (N_2H_4), hipofosfito de sodio (NaPO_2H_2); compuestos los cuales tienen costos elevados y se ha demostrado que son tóxicos para el medio ambiente. Utilizando este método es posible que existan trazas de los químicos utilizados, con la posibilidad que las características y propiedades de las nanopartículas de la plata se pierdan (Ledezma A., Romero J., Hernández M., Moggio I., Arias E., 2014). Otro método utilizado es la radiólisis, método en el que se utiliza muestras acuosas, estas muestras deben ser expuestas a rayos gamma de alta energía, la radiólisis utiliza energías de 103-104 eV (electrón voltio) por un cierto tiempo buscando obtener como resultado nanopartículas de metales, la ventaja principal de este método es la producción de nanopartículas homogénea e inmediata.(Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009).

El método de reducción fotoquímica o también llamada fotólisis es una técnica la cual utiliza soluciones acuosas las mismas que deben ser expuestas en radiación UV por debajo de 60 eV, en este método se utiliza agua con el objetivo de que los iones metálicos empiecen a moverse rápidamente obteniendo la separación de átomos metálicos y finalmente generando nanopartículas coloidales (Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009) . Otra técnica llamada el depósito en fase vapor, es una técnica realizada en una cámara al vacío utilizando elementos volátiles, trata sobre la descomposición de estos elementos, después que todo el elemento volátil se pierda, existirá una fina capa de nanopartículas. Otra técnica titulada Síntesis solvotermal utiliza metales disueltos en un líquido esta mezcla debe estar en un recipiente cerrado y se calienta con temperaturas más altas que el punto de ebullición, normalmente la técnica se maneja a temperaturas mayores de 100°C y a 1 bar de presión, esta presión permitirá la separación de las nanopartículas metálicas. (Zanella, 2012)

2.4.2. Métodos físicos

Un método físico muy aplicado para obtener nanopartículas de plata es el método de la evaporación térmica, técnica en la cual una solución acuosa es sometida a calor hasta su completa evaporización esta técnica debe ser llevada a cabo en una cámara al vacío la cual condensará al vapor sobre una lámina con menor temperatura obteniendo la separación de capas junto con nanopartículas metálicas. Otro método físico es la molienda donde partículas de tamaño macro son transformadas a tamaño nanométrico, este método puede producir cambios estructurales que pueden alterar las propiedades de nanopartículas, se debe tomar en cuenta que este es un método costoso debido a la maquinaria sofisticada que requiere. Otra técnica titulada irradiación con microondas da como resultado nanopartículas con una dispersión de tamaño muy bajo, esta técnica utiliza campos eléctricos los cuales calientan solventes polares y en ese momento los componentes moleculares giran y pierden energía, se pierde energía eléctrica por la resistencia eléctrica que tuvo el material dando como resultado la separación de nanopartículas. Este es un método rápido y efectivo. (Zanella, 2012)

2.4.3. Método biológico

Conocido como síntesis verde es un método nuevo para la obtención de materiales a escala nanométrica amigable con el medio ambiente, no es tóxico, este método hace el uso de bacterias, levaduras, hongos, plantas o extracto de plantas, la eficiencia de la síntesis de nanopartículas ocupando este método puede ser igual o sobrepasar a las técnicas químicas y físicas, tiene un costo menor a comparación de otras técnicas (Ledezma A., Romero J., Hernández M., Moggio I., Arias E., 2014). La técnica de síntesis verde es ecológica, como desventaja principal es el tiempo de reacción y las escalas de producción de nanopartículas son muy bajas (Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009)

2.5 Métodos de identificación de nanopartículas

2.5.1 Espectroscopia Uv-vis

Normalmente la espectroscopia se utiliza en nanomateriales ya que ésta prueba permite conocer si la síntesis de nanopartículas terminó

satisfactoriamente, el pico de absorción de nanopartículas de plata se encuentra alrededor de 400 nm y depende de distintas variables como son el tamaño y forma de las nanopartículas y aumenta conjuntamente con el tamaño de las nanopartículas, se conoce que un pico de absorción de 400 nm pertenece a nanopartículas con un diámetro de alrededor de 5nm, un pico de absorción de 420 nm pertenece a nanopartículas con diámetros alrededor de 20 nm. (Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009)

2.5.2 Microscopia Electronica De Transmision (Met)

Esta técnica permite identificar el tamaño, forma y estructura de las nanopartículas, con esta técnica se obtiene dos imágenes llamadas campo oscuro y campo claro, en el campo claro se muestran los electrones que propagan a través de la muestra y el oscuro muestra los electrones difractados, en el equipo de microscopia electrónica se puede medir materiales de hasta 0.1 nm. (Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009)

2.5.3. Espectroscopia Raman.

La técnica de espectroscopia permite la interacción de moléculas con un fotón de luz, los desplazamientos de longitud de onda dependen directamente de la estructura química de las moléculas. La intensidad del pico de este método depende de la polarizabilidad de la molécula.

2.5.4. Espectroscopia de infrarrojo

Esta técnica utiliza la radiación de 12800 y 10cm^{-1} que son igual a longitudes de 0.78 a 1000 nm de nanomateriales, se basa en vibraciones de las moléculas, las posiciones no siempre son las mismas si no que fluctúan continuamente por las vibraciones dadas, en este método se va a detectar especies químicas

2.6. Toxicidad de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata tienen varias aplicaciones ya sea dentro de la industria alimentaria, medicinal, de producción industrial, y tomando en cuenta que las podemos encontrar en distintos productos en el mercado, estas pueden

entrar a nuestro cuerpo por varias formas ya sea por exposición oral, respiratoria y dérmica. (Avalos et al., 2013)

2.6.1. Vía oral

Al momento de hablar del contacto oral ya sea por medio de un alimento indirectamente está asociado al tracto gastrointestinal. Tras el consumo de plata es posible que esta cambie a su forma iónica, esto se debe al pH ácido del estómago, de igual manera es probable que pase lo mismo con las nanopartículas de plata. Varias investigaciones nombran que es probable que las nanopartículas o iones de plata pasen del intestino al torrente sanguíneo y puedan causar argiria. (Avalos et al., 2013)

Argiria es una enfermedad causada por la absorción de productos con grandes cantidades de plata; se produce cuando la cantidad supera a la capacidad de excreción del cuerpo ya sea renal o hepática, la plata se empieza almacenar en la piel, mucosas órganos internos incluido los ojos, médula ósea y sistema nervioso, la cantidad de plata exacta para generar esta enfermedad aún se desconoce. (Lencastre y João, 2013)

Además se han encontrado residuos de plata en riñones, páncreas, pulmones, corazón y cerebro la única eliminación de plata en nuestro sistema es por medio de vía de excreción y hepática (Avalos et al., 2013)

2.6.2. Vía respiratoria

Después la inhalación de sólidos con nanopartículas de plata se ha observado depósitos dentro de la cavidad nasal, pulmonar y en ganglios. Los depósitos de las nanopartículas de plata tienen respuesta inflamatoria, los depósitos pueden ser eliminados por medio del sistema mucociliar, sistema linfático y la disolución de las nanopartículas de plata en el torrente sanguíneo. (Avalos et al., 2013)

2.6.3. Vía dérmica

La toxicidad por vía dérmica se da cuando las nanopartículas de plata fueron utilizadas en productos textiles, medicamentos para quemaduras, heridas y maquillaje. En trabajos de investigación se ha podido observar que el uso

directo de nanopartículas en la piel da como resultado la argiria. (Avalos et al., 2013)

2.6.4. Toxicidad

Varias investigaciones nombran que la toxicidad de las nanopartículas está directamente alineado a su dimensión, solubilidad, forma y aglomeración de la misma.

2.6.4.1. Estado de aglomeración

Las nanopartículas siempre tienden a aglomerarse, esto influye directamente en la toxicidad por ser un sistema firme el área de la superficie es más reducida y la toxicidad será menor. (Avalos et al., 2013)

2.6.4.2. Forma

En varios trabajos de investigación detallan que las nanopartículas de plata en forma de triángulo son más tóxicas a diferencia a las que tienen formas esféricas y alargadas, esto se da porque al ser una figura con más lados el área de contacto es mucho más amplio y su presencia es más tóxica. (Avalos et al., 2013)

2.6.4.3. Solubilidad

Las nanopartículas cuando se disuelven pierden su estructura estas ya no son tóxicas para el ser humano. (Avalos et al., 2013)

2.6.4.4. Tamaño

Es una de las propiedades más importantes en las nanopartículas por que influye directamente a la toxicidad, entre más grande son las nanopartículas más tóxicas son para el ser humano (Avalos et al., 2013)

2.7. Descomposición de alimentos por microorganismos

El crecimiento de microorganismos en los alimentos es el resultado de la unión de factores como temperatura del ambiente, actividad de agua (aw) del alimento y pH del alimento. (Carrillo, Ramírez, y Catilleja, 2009)

Datos muestran que alrededor de un tercio de alimentos destinados a consumo humano se descomponen y pierden sus características organolépticas por

consecuencia de factores químicos, físicos y biológicos. Los golpes o cortes en frutas y verduras producen deterioro, si existe proliferación de microorganismos existirá cambios de textura, coloración, y olor característico a podredumbre, se debe tomar en cuenta que varios microorganismos pueden producir toxinas siendo un peligro para la salud de las personas que consumen alimentos contaminados. (González, Tarón, y Pérez, 2017)

2.8. Hongos

El reino de los hongos también llamado reino Fungi es un conjunto de microorganismos conformado por levaduras y hongos filamentosos conocidos como mohos. Los mohos son organismos eucariotas multicelulares constituidos por micelios, los micelios son un conjunto células alineadas llamadas hifas, el micelio es visible ya sea que se encuentre en la parte externa o interna del alimento. Para la supervivencia de los hongos es necesaria una sustancia llamada metabolito primario formada de proteínas carbohidratos y lípidos, los metabolitos primarios les permiten un rápido crecimiento. Los metabolitos secundarios no son necesarios para el crecimiento del hongo en si se conforma por antibióticos y micotoxinas. La palabra micotixina se deriva de dos palabras griegas mikes y toxina que significa veneno y hongo. (Jose Migel Soriano, 2007)

2.9. Clasificación taxonómica *Colletotrichum spp.*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: No asignado

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

2.10. Antracnosis

Se le conoce como antracnosis a la enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum*, antracnosis en griego significa “carbón”. Esta enfermedad se la puede ver presente en frutos, hojas y tallo de la planta hospedera mostrándose con lesiones negras, hundimientos, y esporas. Ataca a

varios cultivos como solanáceas, cereales, leguminosas, cítricos y hortalizas, La antracnosis es un serio problema para todo cultivo en post cosecha debido a las pérdidas que ocasiona.(Santacruz Delgado, 2013)



Figura 2. Frutos de tomate de árbol *Solanum betaceae* con signos de antracnosis.

Tomado de: (Ernesto Delgado Fernández, 2010)

2.11. Sintomatología

Normalmente al inicio la enfermedad se presenta con manchas y hundimientos en forma circular, al pasar del tiempo se empiezan ablandar, normalmente las manchas tienen un diámetro de 2 a 3 cm, en el centro de hundimiento se empieza a endurecer y toma un color negro, esta capa dura empieza a crecer hasta que ataca al fruto llevándolo a la pudrición. En ocasiones este crecimiento puede ser acelerado debido al acompañamiento de otros microorganismos, dependiendo las condiciones del fruto pueden aparecer esporas de color gris o color rosa, este hongo se encuentra invernando en plantas afectadas, en semillas. Las temperaturas altas y la humedad favorecen al desarrollo proliferación y multiplicación del hongo. (Santacruz Delgado, 2013)

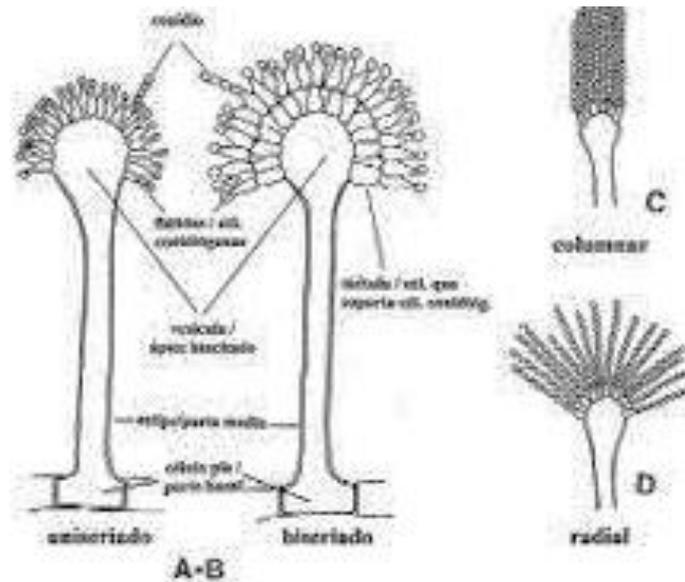


Figura 3. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*.

Tomado de: (Abarca, 2000)

2.12. Diseminación

Sus conidios se liberan y solo se extienden si los acérvulos están húmedos, normalmente son esparcidos por lluvias o gotas de agua también pueden ser transportados por el viento, insectos, animales, herramientas. Normalmente la infección ocurre durante días con humedad relativa aproximada de (80%) y caluroso. (Santacruz Delgado, 2013)

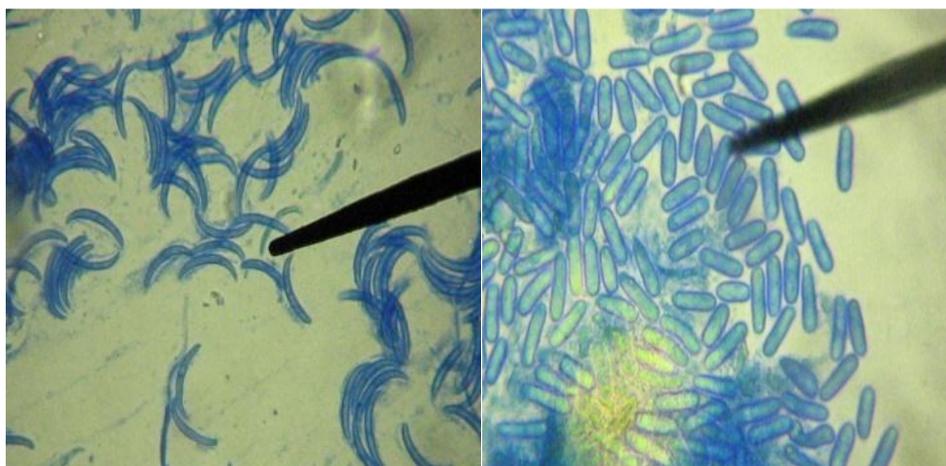


Figura 4. Conidias hongo *Colletotrichum* spp.

Tomado de: (Santacruz Delgado, 2013)

2.13. Identificación de las especies *Colletotrichum spp.*

La identificación y caracterización en microbiología siempre se lo ha realizado por medio de características morfológicas como tamaño, forma de conidias, características del cultivo microbiológico como color de colonia, desarrollo, forma, textura, condiciones ambientales. En la actualidad la técnica precisa para identificar las especies son las herramientas de diagnóstico molecular en donde la identificación es específica, esta técnica ha facilitado el manejo y control de enfermedades. (Santacruz Delgado, 2013)

2.13.1. *Colletotrichum acutatum*

Ataca a plantas dicotiledóneas y gimnospermas, sus síntomas normalmente se les encuentra en las flores, hojas, peciolo y raíces; *Colletotrichum acutatum* se reporta como el hongo patógeno más fuerte comparándolo con las otras especies. Sus conidias se caracterizan por tener un lado puntiagudo son conocidas como fusiformes. Al principio las colonias son blancas pasado el tiempo toman un color rojo o anaranjado. El crecimiento de *Colletotrichum acutatum* es más lento comparándolo con otras especies (Santacruz Delgado, 2013)

2.13.2. *Colletotrichum capsici*

Sus conidias tienen paredes lisas, son uniceladas, tiene extremos estrechos y punteados, en el medio de cultivo *Colletotrichum capsici* al principio son de color blanco y después de cierto tiempo cambian a color verde con gris, este hongo puede alcanzar a medir de 88mm de diámetro. (Santacruz Delgado, 2013)

2.13.3. *Colletotrichum gloesporioides*

Tiene conidias unicelulares con un extremo redondo y otro en forma de punta, tiene setas de color negro los conidióforos son pequeños y rectos. (Santacruz Delgado, 2013)

2.13.4. *Colletotrichum coccodes*

El micelio tiene color blanco, sus conidias son fusiformes, rectas, se le asocia más con la antracnosis de hojas y semillas. (Santacruz Delgado, 2013)

2.14. Protocolo para aislamiento de *Colletotrichum*

2.14.1. Recolección de material vegetal

Se debe recolectar frutos con síntomas de la enfermedad provocada por el hongo *Colletotrichum*, se puede realizar una observación minuciosa del crecimiento del hongo.(Alvarez, Ospina, Mejia, y Llano, 2007)

2.14.2. Aislamiento y purificación

Para el aislamiento se debe realizar cortes de los frutos recolectados, se recomienda utilizar tejido sano con tejido enfermo, se procede a lavar los cortes con agua corriente y se debe lavar ya sea con hipoclorito de sodio o con alcohol, y se realiza la siembra directa en el medio de cultivo, pasado de 7 a 10 días se realiza la purificación es decir se toma muestras del hongo crecido y se vuelve a sembrar en nuevas cajas Petri, colocando las esporas hacia el medio del cultivo. (Alvarez et al., 2007)

2.14.3. Identificación

Para la identificación del hongo es necesario realizar una observación de las estructuras del hongo en el microscopio ya que cada microorganismo tiene diferente estructura ya sea en forma y color, características las cuales nos van a permitir identificar, sin embargo para una identificación más acertada se debe utilizar marcadores moleculares (Alvarez et al., 2007)

2.15. Cultivo de tomate de árbol

El tomate de árbol es uno de los principales frutos andinos cultivado en su mayoría en Colombia y en Ecuador, normalmente el tomate de árbol se lo consume en fresco. (Jaramillo, Gutierrez, Cotes, Gonales, y Marin, 2011) En el Ecuador la producción de esta fruta está dada por pequeños y medianos productores ubicados en la cordillera, existen varios limitantes en la región como son la calidad del fruto, insectos y enfermedades. (Arroyo et al., 2016). La producción del tomate de árbol en el Ecuador tiene pérdidas en grandes cantidades esto se debe a la enfermedad antracnosis, las pérdidas se dan por la disminución de la calidad en del fruto y por el bajo control de la enfermedad. El hongo patógeno habita en la semilla y siendo la semilla la fuente de

obtención de una nueva plántula esta crece con el patógeno y afectará a los frutos futuros. (Pinto Liliana, Tiaguaro Carla, 2012). En varios estudios se ha encontrado que en Colombia como en Ecuador la antracnosis ha causado pérdidas hasta del 100% de la producción, el manejo químico para la enfermedad no es suficiente para poder controlar al hongo además de sus altos costos no es favorable para el medio ambiente. El uso de fungicidas esta provocado tolerancia del hongo patógeno (Patiño, Hoyos, y Afanor, 2007). El hongo patógeno puede atacar al fruto en cualquier estado fenológico, los frutos mostraran lesiones que con el paso del tiempo se van a tornar de color negro y en la mitad del daño ocasionado se formará un polvo de color rosado que será las esporas de hongo y después de un tiempo el fruto se secará hasta quedar momificado. (Arroyo et al., 2016).

3 MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS

3.1. Materiales

3.1.1 Materiales de Laboratorio

- Vasos de precipitación
- Pipetas 10ml
- Probeta 100ml
- Probeta 50ml
- Bureta de 25ml
- Tubos de ensayo
- Papel aluminio
- Tabla de madera
- Cuchillo
- Matraz erlenmeyer
- Soporte universal
- Embudo buchner
- Varilla de vidrio para agitar
- Matraz aforado de 50ml
- Malla plástica extruida 1cm x 1cm

- Espátula metálica estéril
- Micro pipeta
- Frascos estériles
- Pinzas
- Bisturí
- Cajas Petri
- Sacabocados de laboratorio
- Aguja de disección

3.1.2. Equipos

- Balanza
- Balanza Analítica
- Plancha calentadora con agitador magnético
- Incubadora
- Licuadora
- Bomba al vacío
- Lamina de flujo laminar
- Lámpara de alcohol
- Microscopio
- Espectrómetro GENESYS 10S UV-Vis
- Micropipeta
- Calibrador

3.1.3. Materia prima

- Tomate de Árbol con síntomas de antracnosis
- Papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad Super Chola
- Nitrato de Plata 99.5%
- Agar SDA (Sabouraud Dextrosa Agar)+ cloranfenicol
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio 5%
- Alcohol 99%
- Silicagel

- Papel filtro

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ubicación del experimento

El trabajo de titulación se desarrolló en la Universidad de las Américas sede Queri dirección José Queri y Av. de los Granados cantón Quito, Pichincha y en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP) sede Tumbaco dirección Av. Interocianica km 15 y Eloy Alfaro, cantón Quito, Pichincha.

En la Universidad de las Américas se desarrolló la síntesis de nanopartículas de plata, la determinación de la presencia de nanopartículas en las diferentes soluciones. En el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP) sede Tumbaco se desarrolló el aislamiento, purificación e identificación del hongo patógeno en estudio además se desarrolló la evaluación de la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata.

3.2.2. Estadística

En el presente estudio se utilizó un Diseño Completamente al Azar en arreglo factorial 3x3 con tres repeticiones.

La unidad experimental está conformada por una caja Petri con el hongo *Colletotrichum spp* debidamente aislado, purificado e identificado, colocado en Agar PDA+ clorafenicol junto con nanopartículas de plata. El factor uno es la concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de agua milli Q y el factor dos es la contracción de papa (gramos) en 100 ml de agua destilada teniendo 9 tratamientos de soluciones de nanopartículas de plata en diferente concentración, descritos en la tabla1.

F1: Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de agua milli Q

F2: Concentración de papa (g) en 100 ml de agua destilada

Tabla 1.

Descripción de tratamientos

TRAT	DESCRIPCION	FACTOR 1	FACTOR 2
1	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)	8.5	30
2	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada)		15
3	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +5 ml de (7.5g de papa en 100 ml de agua destilada)		7.5
4	(24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)	24	30
5	(24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada)		15
6	(24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +5 ml de (7.5g de papa en 100 ml de agua destilada)		7.5
7	(85 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)	85	30
8	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada)		15
9	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +5 ml de (7.5g de papa en 100 ml de agua destilada)		7.5

Esquema de un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 3x3

Tabla 2

Esquema del análisis de varianza de las variables del presente estudio

Fuentes de Variación	Grados de Libertad
Total	26
F1	2
F2	2
F1 X F2	4
Error Experimental	18

Hipótesis

Ho: La concentración de nitrato de plata influye en el crecimiento del hongo.

Ha: La concentración de nitrato de plata no influye en el crecimiento del hongo.

Ho: La concentración de papa influye en el crecimiento del hongo.

Ha: la concentración de papa influye en el crecimiento del hongo.

Análisis Funcional

Si los resultados tienen diferencias estadísticas entre factores y/o tratamientos para las diferentes variables evaluadas, se realizará la prueba de separación de medias de Tukey al (5%).

3.2.3. Variables

3.2.3.1. Diámetro de Crecimiento (mm)

Se tomaron datos del diámetro del hongo de cada tratamiento a los 7 días de incubación, se realizó la medición con un calibrador.

3.2.3.2. Índice Anti fúngico (%)

Con los datos recolectados del diámetro del hongo de cada tratamiento, se

calculó el índice antifúngico (IA) con la fórmula que se detalla a continuación

$$IA = \left(1 - \frac{D1}{D2}\right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

D1: medida del diámetro del micelio de los tratamientos con nanopartículas

D2: medida del diámetro del micelio en el control.

3.3.3. Manejo del experimento

3.3.3.1. Preparación extracto de papa

Se preparó tres soluciones de papa (*Solanum tuberosum*) de la variedad Super Chola, con madurez fisiológica sobre madurez, se lavó la papa con agua destilada para eliminar la presencia de partículas extrañas a la papa, se procedió a cortar y licuar con agua destilada según el procedimiento resumido en la siguiente tabla.

Tabla 3

Preparación de extractos (gramos de papa variedad Super Chola) / Mililitros de agua destilada)

Extracto	Gramos papa (<i>Solanum tuberosum</i>) variedad Super Chola	Mililitros de agua destilada
1	30	100
2	15	100
3	7.5	100

Cada uno de los extractos fueron hervidos por cinco minutos y a continuación filtrados al vacío y almacenados en frascos de vidrio. (Calle y Londoño, 2014). Para filtrar cada uno de los extractos se utilizó una bomba de vacío marca GAST modelo DOA-P704-AA Hz. 60. En el embudo buchner se colocó el papel

filtro junto con 20 láminas de la malla plástica extruida de 1cm x 1 cm seguido de 10g de silicagel para que el filtrado sea óptimo.

3.3.3.2. Síntesis de nanopartículas de plata

Para la síntesis de nano partículas se preparó nueve soluciones de nitrato de plata (AgNO_3) en diferentes concentraciones, cada una disuelta en 50ml de agua milliQ a una temperatura que oscila entre 50°C a 60°C y constante agitación. Los extractos de papa anteriormente preparados fueron agregados gota a gota a las diferentes soluciones de nitrato de plata controlando temperatura y agitación durante una hora, como se indica a continuación en la tabla numero 4

Tabla 4

Detalles de soluciones

TRATAMIENTO	DETALLES
1	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)
2	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada)
3	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 5 ml de (7.5g de papa en 100 ml de agua destilada)
4	(24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)
5	(24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada)
6	(24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 5 ml de (7.5g de papa en 100 ml de agua destilada)
7	(85 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 8 ml de

	(30g de papa en 100 ml de agua destilada)
8	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada)
9	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 5 ml de (7.5g de papa en 100 ml de agua destilada)

Las soluciones tuvieron que reposar durante una hora a temperatura ambiente y fueron recubiertas con papel aluminio y almacenadas a 5°C.

La síntesis de nanopartículas se verifica con el cambio de color de la solución (Calle y Londoño, 2014).

3.3.3.3. Evaluación de la presencia de nanopartículas de plata en las diferentes soluciones

Para la evaluación de la existencia de nanopartículas de plata en las diferentes soluciones se escogió una solución ya preparada y se llevó al espectrofotómetro, se ingresó en el equipo la muestra junto con el blanco (agua destilada) se calibró el equipo en un rango de 400 a 800 nm de longitud de onda y se corrió el análisis, lo que permitió determinar la presencia de nanopartículas en una longitud de onda específica (425nm).

Se midió la absorbancia de las nueve soluciones preparadas ocupando la metodología dada por Alberto Iglesias Cerveto y Octavio Calzadilla Amaya (2007), se midió la absorbancia en una longitud de onda de 425nm; en primer lugar se midió la absorbancia con agua destilada seguido de la medición de cada una de las 9 soluciones descritas anteriormente, la solución decima es la muestra testigo la cual será agua destilada; Se tomaron datos con 3 repeticiones.

Se realizó una curva de calibración con plata, con los datos obtenidos de absorbancia se llegó a conocer la concentración de plata de cada una de las soluciones anteriormente preparadas.

3.3.3.4. Recolección del material vegetal

El acopio del material vegetal (tomate de árbol) se realizó en la “Granja experimental UDLA” en donde se cosechó tomates de árbol con síntomas de la enfermedad antracnosis.



Figura 5. Material vegetal obtenido en la Granja Experimental UDLA

3.3.3.5. Aislamiento

Se lavaron los tomates de árbol con agua corriente durante un minuto, a continuación, se realizaron cortes en el fruto de la zona contaminada junto con la zona libre del hongo, estos fragmentos fueron cortados en pedazos más pequeños.

Todos los cortes fueron colocados en un vaso de precipitación y se lavaron con agua destilada, seguido se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% por 40 segundos y a continuación se realizó tres enjuagues con agua destilada.

En la cámara de flujo laminar, se sembraron los cortes sumergiendolos al agar SDA+ cloranfenicol, formando una “X” con los cortes, como se muestra en la

figura 6. Todo este procedimiento se lo realizó con material estéril, en una cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas. La cajas Petri fueron incubadas por 6 días a 25°C.

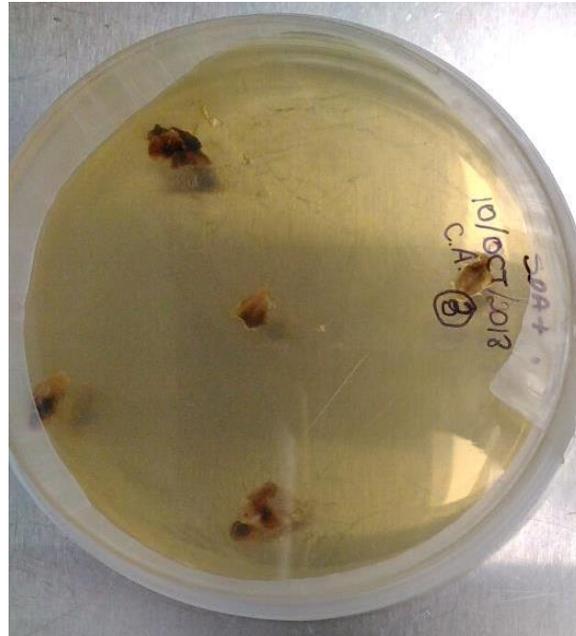


Figura 6. Siembra de cortes contaminados en Agar SDA+cloranfenicol

3.3.3.6. Purificación

Después del aislamiento se debe escoger la muestra con la cual se va a realizar la purificación, características como el tamaño y posible contaminación nos permiten escoger la mejor muestra. Seguido se realizó cortes con un sacabocados de laboratorio de 5mm y se sembró en otra caja Petri con Agar PDA +cloranfenicol sembrándolo en la mitad de la caja, se sembró el micelio con vista hacia el agar. Todo este procedimiento se lo realizó con material estéril, en una cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas. Las muestras se vuelven a encubar por alrededor de 15 días a 25°C.

3.3.3.7. Identificación

La identificación se realizó con caracteres morfológicos como la dimensión, estructura, forma de conidias y color. Para realizar la identificación se sacó a una caja Petri de la incubadora al aire libre por 6 horas con el objetivo de que

comience a esporular, con la ayuda de un una cinta de embalaje se tomaron muestras de esporas del hongo patógeno y se observó en el microscopio.

El aislamiento, purificación e identificación se realizó en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP) sede Tumbaco.

3.3.3.8. Evaluación de la actividad antifúngica

Las soluciones de nanopartículas obtenidas anteriormente fueron colocadas en el Agar PDA+ cloranfenicol, Este procedimiento se lo realizó en los laboratorios de química y de microbiología de la Universidad de las Américas sede Queri donde las cajas Petri vacías fueron colocadas en la cámara de flujo laminar en un orden específico y con la ayuda de una micro pipeta se fueron colocando 600 μ L (microlitros) de cada una de las soluciones de nanopartículas en las diferentes cajas petri, seguido se colocó el agar PDA+cloranfenicol, obteniendo 3 muestras de cada una de las 9 soluciones y 3 muestras de control las cuales solo contenían PDA+cloranfenicol; obteniendo como resultado 30 cajas petri.

Las 30 cajas Petri fueron llevadas al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP) sede Tumbaco, en donde se escogió una de las muestra del hongo ya identificado y se realizaron cortes con un sacabocados de 5mm seguido se sembró el corte del hongo en el medio de cada una de las cajas petri con nanopartículas y en las cajas petri de control, el micelio del hongo fue sembrado con vista hacia el agar. Todo este procedimiento se lo realizó con material estéril, en una cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas. Las placas fueron incubadas a 25°C, después de 7 días de incubación se realizaron las mediciones del diámetro para poder medir el índice antifúngico (IA) utilizando la fórmula que se encuentra a continuación.

$$IA = \left(1 - \frac{D1}{D2}\right) \times 100$$

Dónde:

D1: medida del diámetro del micelio de los tratamientos con nanopartículas

D2: medida del diámetro del micelio en el control.

Es importante conocer que el diámetro de crecimiento es inversamente proporcional al índice antifúngico, entre menor medida del diámetro mayor índice antifúngico.

4. RESULTADOS

4.1. Síntesis de nanopartículas de plata

Las soluciones antes del proceso de la síntesis eran incoloras, al momento de sintetizar las nanopartículas de plata se pudo evidenciar en todas las soluciones un cambio de color, los colores varían según la solución. Las tonalidades varían desde el color blanco grisáceo acuoso hasta llegar al dorado. En la siguiente imagen (figura 7) se muestran tres soluciones con sus coloraciones, la solución 1.1 la cual contiene (8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 8 ml de (30gr de papa en 100 ml de agua destilada). La solución 2.1 la cual contiene (24 mg de nitrato de plata+ 50 ml de agua milliQ) + 8 ml de (30gr de papa en 100 ml de agua destilada) y la solución 3.1 (85mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 8 ml de (30gr de papa en 100 ml de agua destilada)



Figura 7. Síntesis de nanopartículas de plata, solución 1.1 ,2.1 ,3.

Tabla 5

Detalles de color de las soluciones

SOLUCION	CONCENTRACION	COLOR
1.2	(8.5mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)	Blanco grisáceo acuoso
2.1	(24 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) +8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)	Blanco Grisaceo
3.1	(85 mg de nitrato de plata en 50 ml de agua milliQ) + 8 ml de (30g de papa en 100 ml de agua destilada)	Dorado

4.2. Evaluación de la presencia de nanopartículas de plata en las diferentes soluciones

Las muestras fueron filtradas antes de realizar la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis. Una de las muestras fue llevada al espectrofotómetro para un análisis de absorbancia en un rango desde 400 hasta 800nm, La máxima absorbancia UV-visible se encontró en el rango de onda de 420 a 430 nm

Tabla 6

Tabulación de máxima absorbancia UV- visible

L. de Onda	Abs
405	0.012
410	0.013

415	0.014
420	0.015
425	0.015
430	0.015
435	0.014
440	0.013
445	0.012

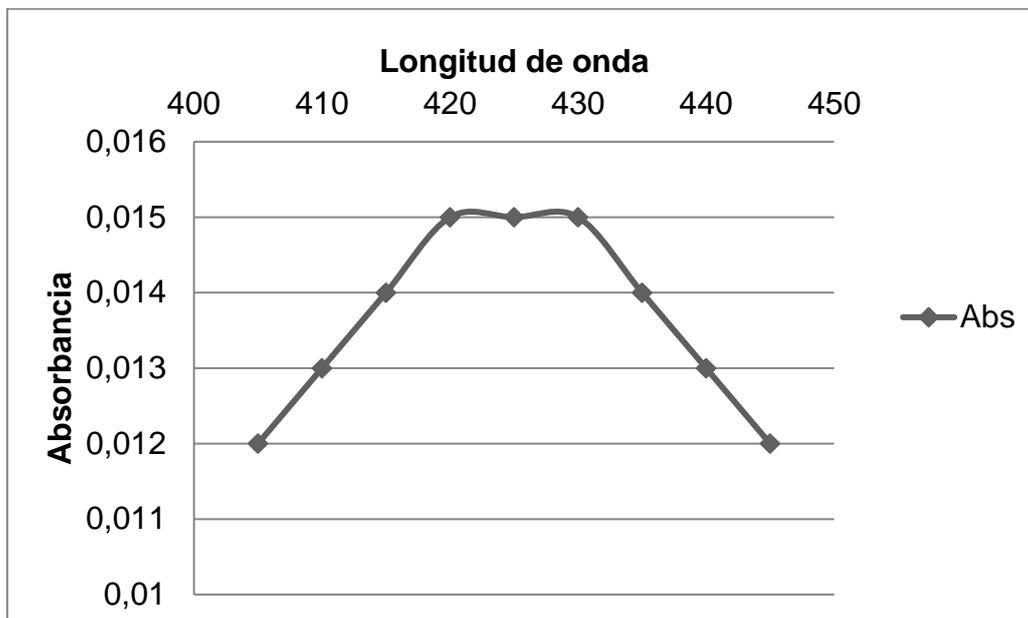


Figura 8. Gráfica de absorbanza vs Longitud de onda

Se realizó la medición de absorbanza de las 9 soluciones con una longitud de onda constante de 425 nm, onda la cual fue seleccionada por ser el promedio de los puntos con mayor absorbanza, se realizaron tres repeticiones de todas las soluciones incluida la muestra blanco (agua destilada) los resultados se muestran descritos en la tabla 6, la solución 1.1. ,1.2 y 2.2 muestran la mayor absorbanza dentro de las nueve soluciones.

Tabla 7

Datos obtenidos en la medición de absorbanza en el rango de onda de 425nm

Solución	Absorbancia
----------	-------------

	Repetición 1 (Abs)	Repetición 2 (Abs)	Repetición 3 (Abs)
1.1	0.271	0.272	0.289
1.2	0.204	0.208	0.212
1.3	0.096	0.100	0.110
2.1	0.050	0.043	0.047
2.2	0.198	0.203	0.202
2.3	0.055	0.053	0.055
3.1	0.040	0.040	0.043
3.2	0.011	0.011	0.014
3.3	0.010	0.020	0.038
Blanco	0.000	0.000	0.000

Posteriormente se realizó una curva de calibración de plata (Tabla 8), el resultado se puede observar en la gráfica 2, con la ecuación obtenida ($y = 0.00252x + 0.0021$) se pudo calcular la concentración de plata de cada una de las soluciones, para esto en primer lugar se calculó el promedio de las tres repeticiones de absorbancia y se procedió a realizar el cálculo.

Tabla 8

Datos obtenidos en la curva de calibración de plata

Ag(mg / ml)	Abs
0	0.003
5	0.127
10	0.251
15	0.39
20	0.498
25	0.625
30	0.763

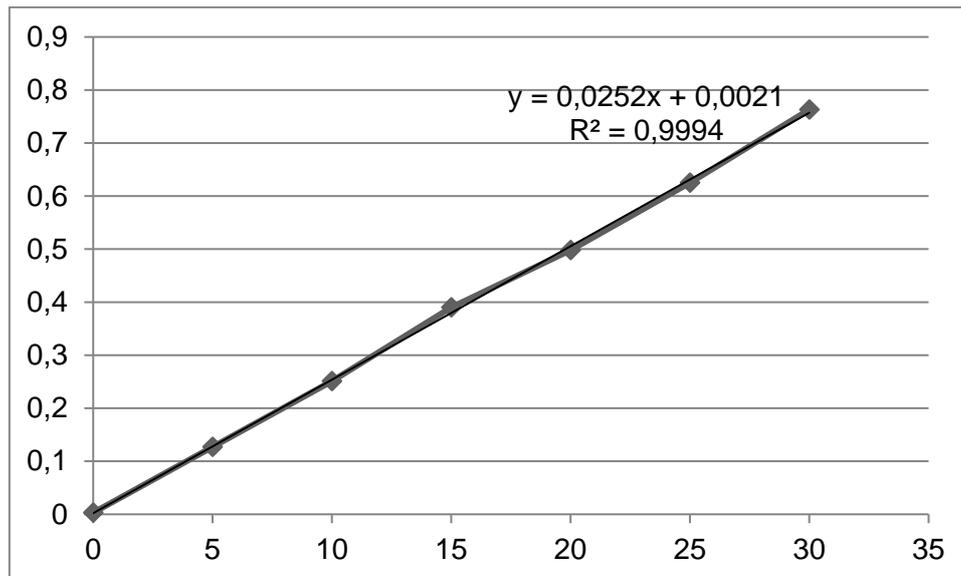


Figura 9. Gráfica de calibración de plata

Tabla 9

Concentración de plata en cada una de las soluciones

SOL.	Rep 1 (Abs)	Rep 2 (Abs)	Rep 3 (Abs)	PROMEDIO (Abs)	CONCENTRACION (mg/ml)
1.1	0.271	0.272	0.289	0.277	0.0091
1.2	0.204	0.208	0.212	0.208	0.0073
1.3	0.096	0.1	0.11	0.102	0.0047
2.1	0.05	0.043	0.047	0.047	0.0033
2.2	0.198	0.203	0.202	0.201	0.0072
2.3	0.055	0.053	0.055	0.054	0.0035
3.1	0.04	0.04	0.043	0.041	0.0031
3.2	0.011	0.011	0.014	0.012	0.0024
3.3	0.01	0.02	0.038	0.023	0.0027

4.3. Identificación del hongo

La identificación se realizó con caracteres morfológicos como tamaño, forma y color. Para realizar la identificación se sacó a una caja Petri de la incubadora al

aire libre por 6 horas con el objetivo de que comience a esporular, con la ayuda de un una cinta de embalaje se tomaron muestras de esporas del hongo patógeno y se observó en el microscopio.; obteniendo como resultado la figura 8 la cual muestra el hongo *Colletotrichum spp.*

Tabla 10

Características de identificación

CONIDIAS	Fusiformes
COLOR	Rojo
FORMA DE CRECIMIENTO	Anillos

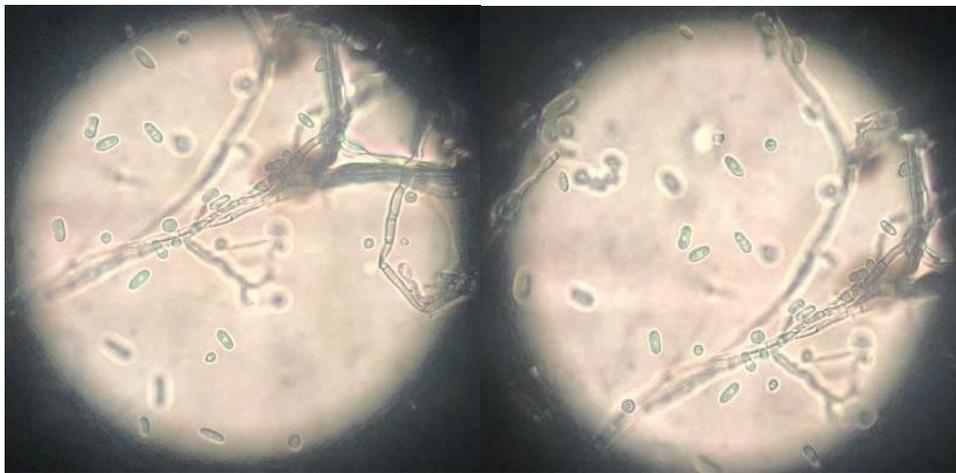


Figura 10. Imagen visualizada a través del microscopio



Figura 11. Hongo medio AGAR PDA + cloranfenicol

4.4. Evaluación de la actividad antifúngica

Después de 7 días de incubación de la siembra del hongo en las 30 cajas Petri de las cuales 27 pertenecían a los 9 tratamientos cada uno con 3 repeticiones las cuales estaban conformadas por AGAR PDA+ Cloranfenicol+ las distintas soluciones además de las 3 cajas control que solo contenían agar PDA+ cloranfenicol, se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 11

Diámetro (mm) del hongo de las 9 soluciones, testigos y sus repeticiones

TRAT	Rep 1	Rep 2	Rep '3
1	35.79	35.00	36.23
2	32.37	33.20	33.83
3	30.00	28.16	27.03
4	26.38	30.35	27.66

5	25.54	29.37	26.36
6	28.13	31.14	26.22
7	35.95	35.58	35.90
8	36.93	38.34	39.38
9	38.55	38.95	38.75
Blanco	40.24	42.90	40.73

En la tabla 9 se puede observar los resultados obtenidos de la medición del diámetro (mm) del micelio del hongo de cada uno de los tratamientos y las cajas control con sus respectivas repeticiones, las mediciones se realizaron con un calibrador electrónico.

La medición de diámetro de crecimiento menor se dio en el tratamiento 5 que contenía Agar PDA+ cloranfenicol junto con la solución 2.2. (24 mg de nitrato de plata + 50 ml de agua milliQ) +5 ml de (15g de papa en 100 ml de agua destilada).

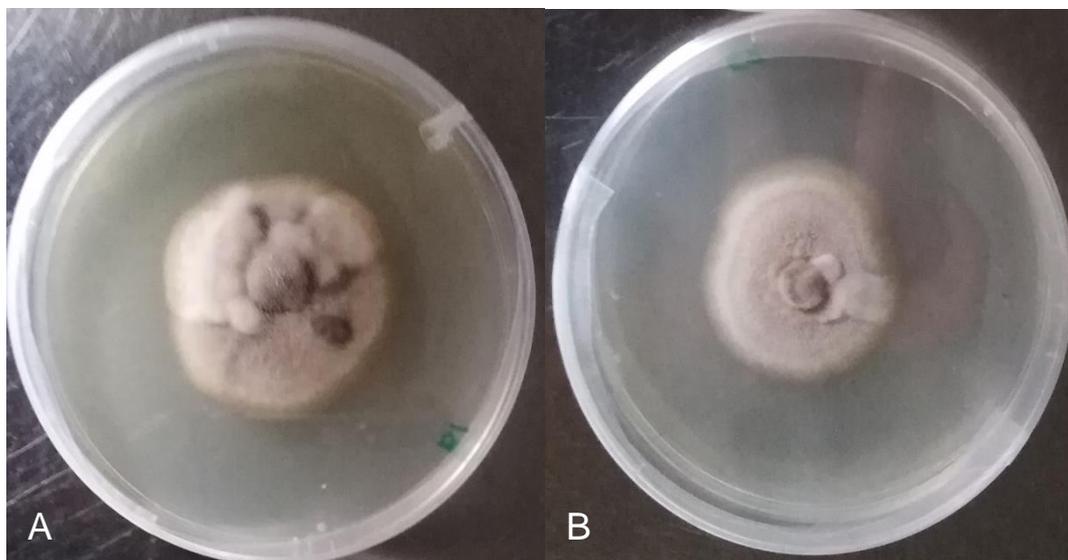


Figura 12. Efecto de la adición de nanoparticulas de plata en el crecimiento miceliar. A: muestra control (42.90 mm) , B: muestra tratamiento 5 (25.54mm).

En la tabla 9 y figura 10. Se puede observar que la adición de nanopartículas de plata en las muestras disminuyó la velocidad de crecimiento comparándolo con el control.

Las mediciones del diámetro son necesarias para calcular el índice antifúngico (IA) para cada una de las soluciones, comparándolos con los respectivos controles y aplicando la siguiente fórmula.

$$IA = \left(1 - \frac{D1}{D2}\right) \times 100$$

Dónde:

D1: medida del diámetro del micelio de los tratamientos con nanopartículas

D2: medida del diámetro del micelio en el control.

Tabla 12

Índice antifúngico (%) de las 9 soluciones y sus repeticiones

TRATAMIENTO	Rep 1	Rep 2	Rep 3
1	11.06	18.41	11.05
2	19.56	22.61	16.94
3	25.45	34.36	33.64
4	34.44	29.25	32.09
5	36.53	31.54	35.28
6	30.09	27.41	35.62
7	10.66	17.06	11.86
8	8.23	10.63	3.31
9	4.20	9.21	4.86
Blanco	0.00	0.00	0.00

En la tabla 10 se puede observar que el índice antifúngico (IA) en los tratamientos 3, 4, 5 y 6 tiene un porcentaje antifúngico aproximadamente del 30%. Teniendo el mayor índice antifúngico el tratamiento 5.

4.5. Diseño experimental

En el presente estudio se utilizó un Diseño Completamente al Azar en arreglo factorial 3x3 con tres repeticiones.

La unidad experimental está conformada por una caja Petri con el hongo *Colletotrichum spp* debidamente aislado, purificado e identificado, colocado en Agar PDA+ cloranfenicol junto con nanoparticulas de plata. El factor uno es la concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milli Q y el factor dos es la contracción de papa (gr) en 100 ml de agua destilada teniendo 9 tratamientos de soluciones de nanoparticulas de plata en diferente concentración, descritos en la tabla1.

En la tabla 11 su muestra las 3 repeticiones realizadas, los factores los cuales son F1: Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milli Q F2: Concentración de papa (gr) en 100 ml de agua destilada y los resultados obtenidos del Índice Antifungico (%) y del diámetro de crecimiento del hongo *Colletotrichum* (mm)

Tabla 13

Tabla del diseño experimental

RE	F1	F2	Diámetro de crecimiento (mm)	Índice antifúngico (%)
1	1	1	35.79	11.06
1	1	2	32.37	19.56
1	1	3	30.00	25.45
1	2	1	26.38	34.44
1	2	2	25.54	36.53
1	2	3	28.13	30.09
2	2	2	29.37	31.54
2	2	3	31.14	27.41
2	3	1	35.58	17.06
2	3	2	38.34	10.63
2	3	3	38.95	9.21

3	1	1	36.23	11.05
3	1	2	33.83	16.94
3	1	3	27.03	33.64
3	2	1	27.66	32.09
3	2	2	26.36	35.28
3	2	3	26.22	35.62
3	3	1	35.90	11.86
3	3	2	39.38	3.31
3	3	3	38.75	4.86

4.5.1. Diámetro de crecimiento del hongo *Colletotrichum*

En la tabla 12 se muestra el Cuadro de Análisis de la Varianza del diámetro de crecimiento del hongo *Colletotrichum*, en donde se puede observar que el Factor 1 (Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milliQ) tiene diferencia estadística e influye directamente en el resultado del diámetro de crecimiento del hongo *Colletotrichum*. En tanto al Factor 2 (Contracción de papa (gr) en 100 ml de agua destilada) no hay diferencia estadística entonces no influye en el resultado del diámetro de crecimiento, finalmente la interacción entre los dos factores F1XF2 tiene diferencia estadística he influye directamente en el diámetro de crecimiento.

Tabla 14

Cuadro de Análisis de la Varianza Diámetro de crecimiento del hongo Colletotrichum (mm)

F de V	GL	SC	CM	FC	FT 5%	P-valor
TOTAL	26	560.9				
F1	2	422.97	211.48	99.71	**	<0.0001
F2	2	8.32	4.16	1.96	Ns	0.1696
F1XF2	4	91.43	22.86	10.78	**	0.0001
EE	18	38.18	2.12			

En la tabla 13 se observa las pruebas de TUKEY del Diámetro de crecimiento del hongo *Colletotrichum* del Factor 1 (Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milliQ) factor en el cual hubo diferencia estadística e influye directamente en el resultado del diámetro de crecimiento del hongo *Colletotrichum*, se muestran las medias y la desviación estándar de cada una de las tres concentraciones de nitrato de plata las letras muestran la diferencia que existe entre ellas.

Tabla 15

Tukey F1 Diámetro (mm) de crecimiento del hongo Colletotrichum

F1 MEDIAS DESVIACION ESTANDAR			
3	37.59	1.41	A
1	32.40	3.13	B
2	27.91	1.88	C

En la tabla 14 se observa las pruebas de TUKEY F1XF2 (Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milliQ) y (Contracción de papa (gr) en 100 ml de agua destilada) respectivamente, interacción la cual hubo diferencia estadística he influye directamente en el resultado del diámetro de crecimiento del hongo *Colletotrichum*, se muestran las medias y la desviación estándar de cada una de las interacciones las letras muestran la diferencia que existe entre ellas.

Tabla 16

Tukey F1X F2 diámetro de crecimiento (mm) del hongo Colletotrichum

F1	F2	MEDIAS	DESVIACION ESTANDAR	
3	3	38.75	0.20	A
3	2	38.22	1.23	A
3	1	35.81	0.20	AB
1	1	35.67	0.62	AB

1	2	33.13	0.73	B
2	3	28.5	2.48	C
1	3	28.4	1.50	C
2	1	28.13	2.03	C
2	2	27.09	2.02	C

4.5.2 Índice Antifúngico

En la tabla 15 se puede observar el Cuadro de Análisis de la Varianza del índice antifúngico, en donde se puede observar que el Factor 1 (Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milliQ) tiene diferencia estadística he influye directamente en el resultado del índice antifúngico. En tanto al Factor 2 (Contracción de papa (g) en 100 ml de agua destilada) no hay diferencia estadística entonces no influye en el resultado del índice antifúngico, finalmente F1XF2 tiene diferencia estadística he influye directamente en el índice antifúngico.

Tabla 17

Cuadro de Análisis de la Varianza Índice Antifúngico

F de V	GL	SC	CM	FC	FT 5%	p-valor
TOTAL	26	3320.23				
F1	2	2505.88	1252.94	98.47	**	<0.0001
F2	2	49.03	24.51	1.93	ns	0.1745
F1XF2	4	536.29	134.07	10.54	**	0.0001
EE	18	229.03	12.72			

En la tabla 16 se observa las pruebas de TUKEY del Factor 1(Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milliQ) en las cuales hubo diferencia estadística he influye directamente en el resultado de índice antifúngico, se muestran las medias y la desviación estándar de cada una de las tres concentraciones de nitrato de plata las letras muestran la diferencia que existe entre ellas.

Tabla 18

Tukey F1 Índice Antifúngico

F1 MEDIAS DESVIACION ESTANDAR			
2	32.47	3.00	A
1	21.45	8.04	B
3	8.89	4.10	C

En la tabla 17 se observa las pruebas de TUKEY F1XF2 (Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de agua milliQ) y (Contracción de papa (gr) en 100 ml de agua destilada). Se puede observar que existe una diferencia estadística significativa, esto quiere decir que los dos factores juntos influyen directamente en el resultado de índice antifúngico, se muestran las medias y la desviación estándar de cada una de las interacciones las letras muestran la diferencia que existe entre ellas.

Tabla 19

Tukey F1X F2 Índice Antifúngico

F1	F2	MEDIAS	DESVIACION ESTANDAR	
2	2	34.45	2.60	A
2	1	31.93	2.60	A
1	3	31.15	4.95	A
2	3	31.04	4.19	A
1	2	19.7	2.84	B
1	1	13.51	4.25	B
3	1	13.19	3.40	B C
3	2	7.39	3.73	C
3	3	6.09	2.72	C

5. DISCUSION

5.1. Síntesis de nanopartículas de plata

Al momento de realizar la síntesis de las nanopartículas de plata se pudo evidenciar en todas las soluciones un cambio de color, las tonalidades de color dependen de la solución debido a que cada una tiene diferente concentración ya sea de nitrato de plata o de soluciones de papa. Las tonalidades varían desde el color blanco grisáceo acuoso hasta llegar al dorado como muestra la figura 7. Como indica Cardeño y Londoño (2014), en su trabajo de investigación titulado "Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*)" evidencia un cambio de color de una solución transparente a una solución con color dorado intenso, Cardeño manifiesta que el cambio de color indica la posibilidad de formación de nanopartículas (Calle y Londoño, 2014). De igual manera en la investigación realizada por Aguilar (2009) titulada "Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: efecto sobre *Colletotricum gloeosporioides*" menciona que existió un cambio de color en todas las soluciones realizadas tomando un color café oscuro dando la posibilidad de existencia de nanopartículas de plata (Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009)

5.2. Evaluación de la presencia de nanopartículas de plata en las diferentes soluciones

Las muestras fueron filtradas antes de realizar la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis. Una de las muestras fue llevada al espectrofotómetro para un análisis de absorbancia en un rango desde 400 hasta 800nm, La máxima absorbancia UV-visible se encontró en el rango de onda de 420 a 435 nm. En la investigación realizada por Aguilar (2009) menciona que un pico de absorción de alrededor de 400nm es un indicativo de la presencia de nanopartículas de plata. Así mismo Cardeño y Londoño (2014), mencionan que un pico de 400nm a 470nm indica la presencia de nanopartículas de plata. De igual manera en la investigación realizada por Sukdeb Pal, Yu Kyung Tak, y Joon Myong Song (2016) detallan que la absorción con una longitud de onda de 420 nm indica la presencia de

nanopartículas de plata esféricas. (Pal et al., 2007)

En los resultados obtenidos, el pico de absorción más alto estuvo en un rango de 420nm a 430nm, cumpliendo el indicativo de presencia de nanopartículas de plata. Según la teoría el tamaño predominante de nanopartículas de plata que se encuentran en un rango de onda de 420nm es de alrededor 20nm.

En la investigación realizada por Jorge Morales, José Moran, María Quintana, Walter Estrada (2009) detallan que el espectro de longitudes de onda de 400 a 450nm muestra la presencia de nanopartículas de plata, además por los resultados obtenidos detallan que la absorción varía debido al crecimiento de las partículas, indican que después de cierto tiempo la absorción puede disminuir (Morales, Morán, Quintana, y Estrada, 2009)

Se realizó la medición de absorbancia de las 9 soluciones con una longitud de onda constante de 425 nm, se realizaron tres repeticiones de todas las soluciones incluida la muestra blanco (agua destilada) los resultados están descritos en la tabla 6, la solución 1.1, 1.2 y 2.2 muestran la mayor absorbancia dentro de las nueve soluciones, comparado con la teoría las soluciones con mayor absorción se debe al crecimiento de las nanopartículas.

5.3. Evaluación de la actividad antifúngica

Existen varias teorías del efecto biocida encontrado en la plata, teorías detalladas en el marco teórico; la teoría también recalca que características como la dimensión y estructura de las nanopartículas de plata influyen directamente en la capacidad biocida.

En las evaluaciones realizadas se puede observar una diferencia entre el crecimiento del hongo control con el crecimiento de los hongos con las distintas soluciones, cuatro de las nueve soluciones llega a inhibir el crecimiento de un 30% del hongo.

En el diseño experimental se puede observar que en las dos variables (diámetro de crecimiento (mm) e índice antifúngico (%)) el factor 1

(Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milli) tiene una gran diferencia estadística, dándonos a conocer que influye en cada uno de los resultados; de igual manera la interacción existente entre los dos factores $f_1 \times f_2$ (F1: Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milli Q F2: Concentración de papa (gr) en 100 ml de agua destilada) tiene diferencia estadística e influye directamente en los resultados de diámetro de crecimiento y del índice antifúngico. En la investigación "Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*" de Miguel Aguilar argumenta que en las pruebas realizadas en su investigación se determinó que las nanopartículas de plata tuvieron efecto fungistático sobre *Colletotrichum gloesporioides* y las variaciones de tamaño de partícula no influye directamente en este efecto. (Miguel Angel Aguilar Mendez, 2009)

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Mediante el método de espectrofotometría se determinó que existió la presencia de nanopartículas de plata en cada una de las soluciones preparadas, permitiéndonos asegurar que todas las soluciones contenían nanopartículas de plata. La solución 1.1; 1.2 y 2.2 muestran la mayor absorbancia dentro de las nueve soluciones.

Es evidente que el uso de nanopartículas de plata retrasó el crecimiento del hongo patógeno en las pruebas de laboratorio. La medición del diámetro de crecimiento menor se dio en el tratamiento 5 el cual contenía Agar PDA+ cloranfenicol junto con la solución 2.2.

El índice antifúngico (IA) en los tratamientos 3, 4, 5 y 6 tienen un porcentaje aproximadamente del 30%, el mayor índice antifúngico tiene el tratamiento 5.

El Factor uno (F1: Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de agua milli Q) controla el crecimiento del diámetro del hongo y por lo tanto el índice antifúngico es mayor.

El estadístico DCA refleja que existen diferencias significativas entre los tratamientos, cada tratamiento inhibe el crecimiento del hongo en diferentes porcentajes, siendo el mejor tratamiento el 5.

El Factor uno (F1: Concentración de nitrato de plata (mg) en 50ml de gua milli Q) y el factor dos (F2: Concentración de papa (gr) en 100 ml de agua destilada) tiene una influencia directa, diámetro de crecimiento y del índice antifúngico.

6.2. Recomendaciones

Para realizar el aislamiento del hongo se recomienda utilizar AGAR SDA + cloranfenicol; Para la multiplicación del hongo se recomienda utilizar AGAR PDA + cloranfenicol, debido a que existió una diferencia en el crecimiento y esporulación del hongo.

Para realizar la filtración de las distintas soluciones de papa junto con agua destilada, se recomienda el uso de diferentes tamices con distintos diámetros, después de este procedimiento se recomienda utilizar una bomba al vacío junto con un embudo buchner papel filtro y láminas de malla plástica extruida de 1cm x 1cm seguido de 10 gr de silicagel, este procedimiento permitirá la optimización del filtrado.

Antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro se recomienda filtrar las soluciones debido a que pueden existir partículas que dificultan y cambian el resultado de la lectura del espectrofotómetro.

Todos los procedimientos realizados en el laboratorio deben hacerse con una asepsia muy estricta para que no exista contaminación y alteración de resultados.

REFERENCIAS

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial.
- Alvarez, E., Ospina, C., Mejia, J., & Llano, G. (2007). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA , PATOGENICA Y GENÉTICA DEL AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum gloeosporioides*) EN GUANÁBANA (*Annona muricata*) EN EL VALLE DEL CAUCA.
- Arroyo, W. F. V., Correa, A. V. S., Sandoval, M. V. T., Castillo, W. A. V., Martínez, A., Díaz, P. F. V., & Ron, L. (2016). Estimación de parámetros de calidad del fruto para segregantes interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en respuesta de resistencia a la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds). *Acta Agronomica*, Recuperado el 31 de Julio 2018 de: <https://doi.org/10.15446/acag.v65n3.49771>
- Avalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2013). NANOPARTÍCULAS DE PLATA: APLICACIONES Y RIESGOS TÓXICOS PARA LA SALUD HUMANA Y EL MEDIO AMBIENTE.
- Calle, L. C., & Londoño, M. E. (2014). Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). Recuperado del 3 de Agosto del 2018 de: <https://doi.org/10.14508/sdp.2014.6.12.129-140>
- Carrillo, Ramírez, & Catilleja. (2009). EFFECT OF SOLUTES ON GROWTH PARAMETERS OF FOOD SPOILAGE MOULDS. Recuperado el 10 de Agosto del 2018 de: <https://doi.org/10.1080/11358120609487685>
- Echavarría, A. M., Robledo, S., & Bejarano, G. (2017). Influencia de las nanopartículas de Ag sobre las propiedades mecánicas y tribológicas y en el efecto citotóxico y bactericida de los recubrimientos de TaN(Ag); Influence of Ag nanoparticles on the mechanical and tribological properties and on the cytotoxic and bactericidal effects of TaN(Ag) coatings. *Revista de Metalurgia*, 53(1). Recuperado de 22 de Agosto del 2018 de:

<https://doi.org/10.3989/revmetalm.085>

Ernesto Delgado Fernández, S. V. M. (2010). Control biológico de la Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc.) en Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante hongos endófitos antagonista.

Foladori, G. (2016). POLÍTICAS PÚBLICAS EN NANOTECNOLOGÍA EN AMÉRICA LATINA. *Problemas Del Desarrollo*. Recuperado el 30 de Agosto del 2018 de: <https://doi.org/10.1016/j.rpd.2016.03.002>

Fúnez, A. Á., Isabel, A., Duaso, H., & Morales Gómez, P. (2016). NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA I: APLICACIONES NANOTECHNOLOGY IN THE FOOD INDUSTRY I: APPLICATIONS. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(2), 1–17. Recuperado del 3 de Septiembre del 2018 de: https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n2.53544

González, R. E., Tarón, A., & Pérez, J. (2017). Biopelículas de gelana cargadas con nanopartículas de plata: Propiedades físico mecánicas, antimicrobianas y de barrera. *Informacion Tecnologica*. Recuperado el 22 de Septiembre del 2018 de: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000600007>

Grande, A. (2007). NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: LA FÍSICA ACTUAL EN LUCHA CONTRA LA ENFERMEDAD. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*.

Jaramillo, M., Gutierrez, P. A., Cotes, J., Gonales, E., & Marin, M. (2011). Detección de los Virus AMV , CMV y PLRV en Cultivos de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav .) en Antioquia , Colombia.

Ledezma A., Romero J., Hernández M., Moggio I., Arias E., P. G. (2014). Síntesis biomimética de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de nopal (*Opuntia* sp.) y su electrohilado polimérico.

- Lencastre, A., & João, A. (2013). Argyria - Case report.
- Miguel Angel Aguilar Mendez. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*.
- Monge, M. (2014). Nanopartículas de plata : métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas, (May).
- Morales, J., Morán, J., Quintana, M., & Estrada, W. (2009). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR LA RUTA Sol-Gel A PARTIR DE NITRATO DE PLATA SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES BY Sol-Gel ROUTE FROM SILVER NITRATE. *Rev Soc Quím Perú. Rev Soc Quím Perú*, 75(752).
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle ? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli* □, 73(6) Recuperado el 24 de Noviembre del 2018 de: <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Patiño, C., Hoyos, R., & Afanor, L. (2007). SELECCIÓN Y REGENERACIÓN in vitro DE SOMACLONES DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betacea* cav. Sendt) UTILIZANDO FILTRADOS DE CULTIVO DE *Colletotrichum acutatum* CON ACTIVIDAD PECTINASA. Recuperado el 12 de Octubre del 2018 de: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.352>
- Pinto Liliana, Tiaguaro Carla, F. C. (2012). Caracterización Morfológica , Patológica y Molecular de la Antracnosis (*C . acutatum*) del Tomate de Árbol y Chocho.
- Santacruz Delgado, C. X. (2013). CARACTERIZACION MORFOLOGICA, PATOGENICA Y MOLECULAR DE ESPECIES DE *Colletotrichum* spp. CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL FRUTO DE AJI Y PIMENTON *Capsicum* spp. EN EL VALLE DEL CAUCA.
- Tahrioui, A., & Hessissen, A. (2016). NANOTECNOLOGÍA Y SUS

POTENCIALES APLICACIONES EN MICROBIOLOGÍA.

Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño.

ANEXOS



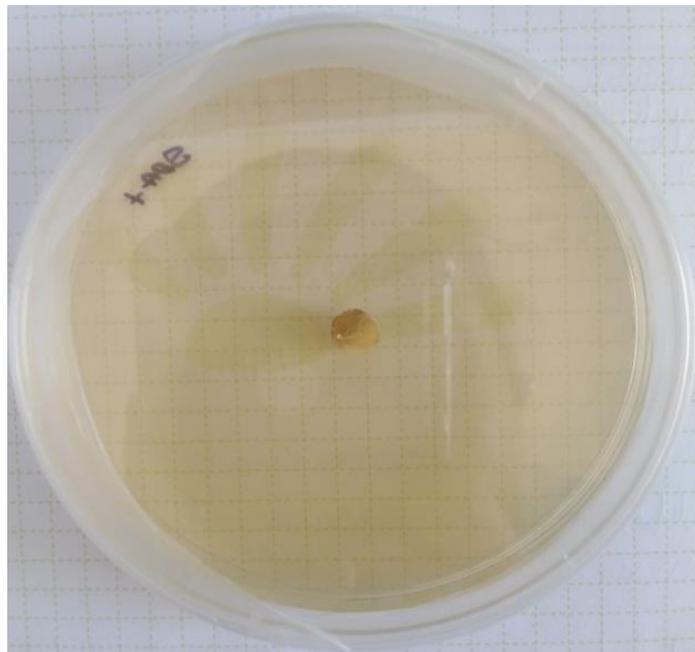
ANEXO 1. Tomate de Árbol con síntomas de antracnosis cosechado de la Granja Experimental UDLA



ANEXO 2. Cortes del tomate de árbol con síntomas de antracnosis de la zona contaminada junto con la zona libre del hongo



ANEXO 3. Crecimiento del hongo proveniente de los cortes del tomate de árbol



ANEXO 4. Purificación del hongo



ANEXO 5. Imagen observada desde un microscopio para identificación del hongo



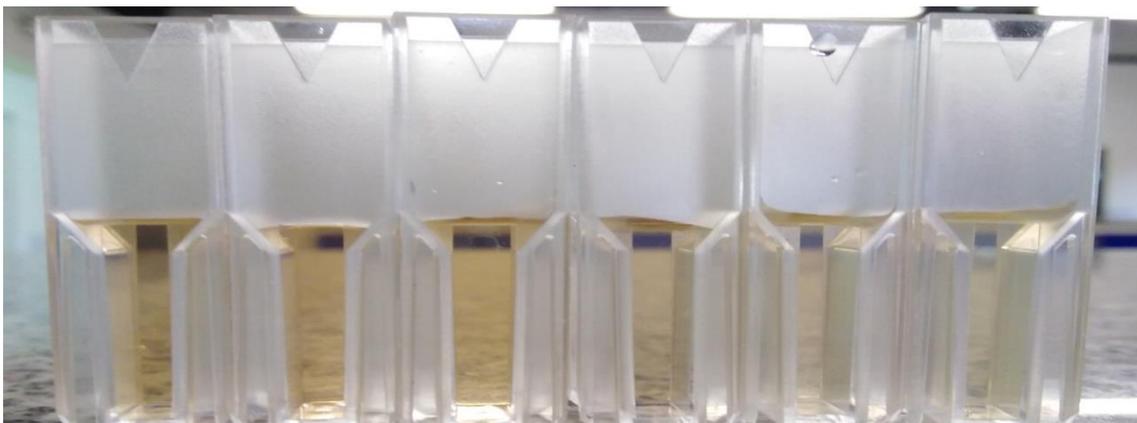
ANEXO 6. Preparación del extracto de papa



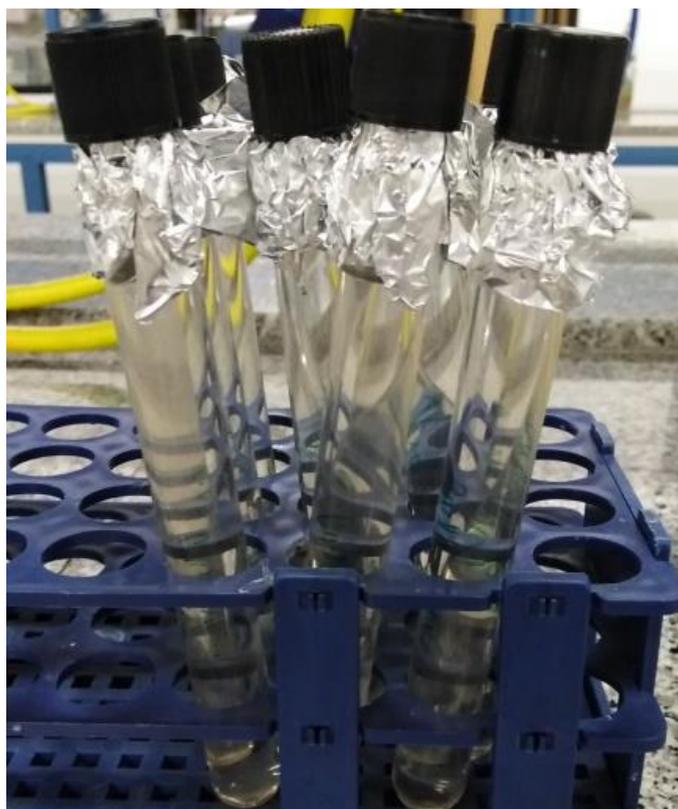
ANEXO 7. Filtración de la solución de papa



ANEXO 8. Síntesis de Nanopartículas de plata



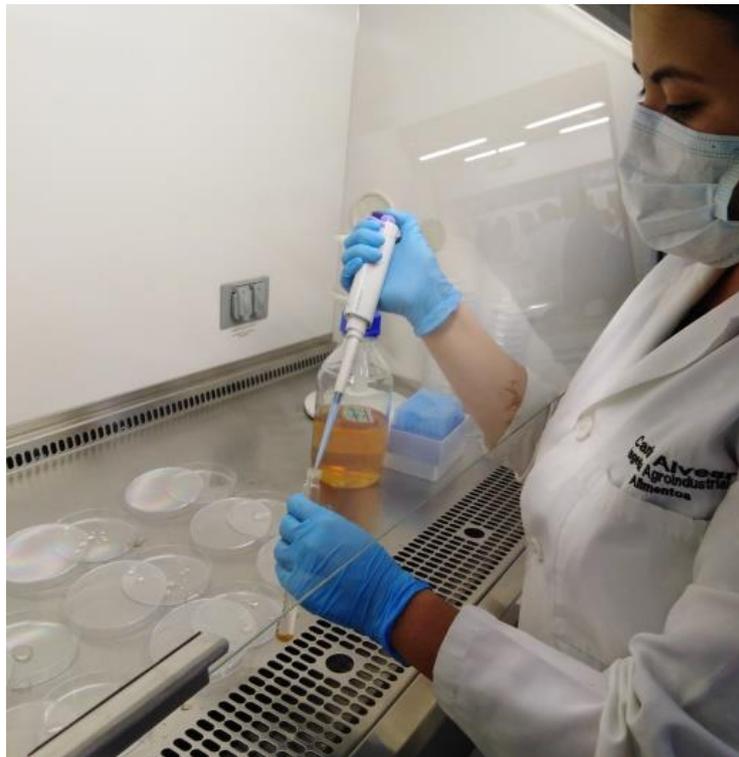
ANEXO 9. Soluciones para lectura en el espectrofotómetro



ANEXO 10. Método de conservación de nanopartículas de plata



ANEXO 11. Soluciones de Nanopartículas de plata



ANEXO 12. Colocación de las nanopartículas en las cajas Petri con agar PDA+Cloranfenicol



ANEXO 13. Crecimiento del hongo en las soluciones con sus respectivas repeticiones



ANEXO 14. Muestras control de hongo *Colletotrichum spp*



ANEXO 15. Medición del diámetro de crecimiento de hongo *Colletotrichum spp*



ANEXO 16. Muestra del hongo *Colletotrichum spp* en Agar PDA+ cloranfenicol junto con las solución 2.2., hongo con el diámetro más pequeño

