



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS  
COBRE/PLATA (Cu/Ag) SINTETIZADAS VÍA QUÍMICA VERDE CONTRA *Aspergillus*  
*flavus* Y *Fusarium verticillioides* DEL GRANO DE MAÍZ DESTINADO PARA LA  
ALIMENTACIÓN ANIMAL

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

RODOLFO MANUEL ROBLES MORALES

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ALMA GUADALUPE VÁZQUEZ DURÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ FUENTES

BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

DR. ROBERTO DÍAZ TORRES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN, ESTADO DE MÉXICO.

OCTUBRE, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatorias**

A mis padres, Juana Morales y Rodolfo Robles, por haberme apoyado siempre, incluso en los peores momentos de mi vida.

A todos mis hermanos, en donde se encuentren, porque han sido un motor para tratar de ser un ejemplo a seguir.

A todas las personas que se cruzaron en mi camino en esta etapa de mi vida, porque todos aportaron una pequeña parte para ser lo que soy.

A Gc, sin ti jamás habría logrado entrar a la maestría, ni me habría esforzado por tratar de dar lo mejor y salir de ella, aunque ya no estés aquí te agradezco.

A Aidee Galarza, por todo tu apoyo este largo año, y ser mi motivación para seguir adelante.

Sobre todo, a ti Lobo Leunam, eres fuerte, pero te crees débil, eres muy fuerte, me lo has demostrado, sigue luchando por ser mejor cada día, que tú seas tú única competencia, lucha por lograr tus sueños y sigue persiguiendo el éxito, porque, aunque pienses que eres un fracaso, ya eres exitoso, ya eres poderoso, y ya eres feliz. Solo te falta creerlo. Solo te falta. Creer en ti.

Sinceramente

Rodolfo Manuel Robles Morales

## **Agradecimientos**

A mi amada universidad, formar parte de tus filas me llena de orgullo, emoción, y ganas de llorar de felicidad. Me siento agradecido con la UNAM por darme tanto, por darme todo.

Le estoy infinitamente agradecido a mi tutora la Dra. Alma Guadalupe Vázquez Durán, por haberme enseñado todo lo que se sobre nanotecnología; la paciencia, el apoyo, la amistad, la comprensión, los regaños, y todo, de verdad gracias.

Al Dr. Abraham Méndez Albores por haberme acompañado en este trayecto, darme tantas enseñanzas, permitirme estar en el laboratorio 14 para lo que fuera necesario, y ayudarme a ser mejor.

A los doctores Dr. Miguel Ángel González Fuentes y al Dr. Roberto Díaz Torres, por su paciencia, por su ayuda comprensión y apoyo cuando se ha requerido, estoy realmente muy agradecido.

Al Dr. Enrique Salas Téllez por su apoyo y permitirme aprender tanto en el laboratorio 17.

Al jurado, Dr. René Rosiles Martínez, Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez, Dra. Laura Hernández Andrade, por su disponibilidad, tiempo y aportaciones.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este proyecto.

A I Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para realizar esta investigación.

Al programa de becas de CONACYT por el apoyo proporcionado a los estudiantes de posgrado.

“Avergüénzate de morir hasta que no hayas conseguido una victoria para la humanidad”

Jürgen Habermas

## Resumen

Fue investigada la actividad fungicida de las nanopartículas bimetálicas (Cu/Ag) sintetizadas mediante la reducción sonó-química de los iones de plata y cobre utilizando extracto acuoso de hojas de *Pyracantha koidzumii*. La formación de nanopartículas bimetálicas (Cu/Ag) fue confirmada mediante las técnicas espectroscopia UV-Vis, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), microscopia electrónica de transmisión (TEM), microscopia electrónica de barrido con espectroscopia dispersiva de rayos X (SEM-EDS). La carga de superficie fue evaluada mediante potencial Z.

La microscopia electrónica de transmisión reveló que las nanopartículas de cobre plata tienen una conformación de tipo core/shell. El análisis por SEM-EDS confirmó la naturaleza bimetálica de las partículas. Las nanopartículas bimetálicas mostraron actividad antifúngica contra los hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*. La concentración mínima inhibitoria se encontró en 85 µg/mL y en 42 µg/mL para *A. flavus* y *F. verticillioides*, respectivamente. Con estos resultados se concluye que las nanopartículas bimetálicas (Cu/Ag) core/shell tienen una importante actividad antifúngica contra los hongos más fitopatógenos más importantes.

**Palabras clave:** *Aspergillus*, *Fusarium*, nanotecnología, nanopartículas, bimetálicas, fungicida.

## **Abstract**

The fungicide activity of bimetallic Cu/Ag nanoparticles synthesized through sonochemical reduction of copper and silver ions with *Pyracantha koidzumii* leaf aqueous extract was investigated. The formation of bimetallic Cu/Ag nanoparticles was confirmed by UV–Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FTIR-ATR), scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), and transmission electron microscopy (TEM). The surface charge of bimetallic nanoparticles was evaluated by means of Z potential. Transmission electron microscopy revealed that nanoparticles were copper-silver core-shell and the EDS analysis confirmed that all particles were bimetallic in nature. Bimetallic nanoparticles exhibited antifungal activity towards *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was recorded at 85 µg/mL and at 42 µg/mL for *A. flavus* and *F. verticillioides*, respectively. From these results, it is concluded that bimetallic copper-silver core-shell nanoparticles have important antifungal activity against the most important fungal phytopathogens.

**Key words:** *Aspergillus*, *Fusarium*, nanotechnology, nanoparticle, bimetallic, antifungal.

## Índice

<b>Introducción</b> .....	1
<b>1. Antecedentes</b> .....	3
<b>2. Hipótesis</b> .....	16
<b>3. Objetivo general</b> .....	17
<b>3.1. Objetivos particulares</b> .....	17
<b>4. Materiales y métodos.</b> .....	17
<b>4.1. Materiales</b> .....	17
<b>4.2. Métodos</b> .....	18
<b>4.2.1. Preparación del extracto acuoso de <i>P. koidzumii</i></b> .....	18
<b>4.2.2. Síntesis de nanopartículas bimetálicas (Cu/Ag)</b> .....	18
<b>4.2.3. Caracterización de las nanopartículas bimetálicas Cu-Ag</b> .....	19
<b>4.2.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis</b> .....	19
<b>4.2.3.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier</b> .....	19
<b>4.2.3.3. Potencial Zeta y dispersión dinámica de luz</b> .....	20
<b>4.2.3.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM) – EDS acoplado</b> .....	21
<b>4.2.4. Ensayos microbiológicos.</b> .....	21
<b>4.2.4.1. Determinación de la MIC de nanopartículas bimetálicas mediante el método de microdilución.</b> .....	21
<b>4.2.4.2. Prueba confirmatoria de la MIC de nanopartículas bimetálicas</b> .....	22
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	23
<b>5.1. Optimización de la condiciones de síntesis y caracterización de las nanopartículas bimetálicas Cu-Ag</b> .....	23
<b>5.1.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis</b> .....	23
<b>5.1.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier</b> .....	29
<b>5.1.3. Potencial zeta y dispersión dinámica de luz</b> .....	32
<b>5.1.4. Microscopia electrónica de transmisión</b> .....	34
<b>5.1.5. Microscopia electrónica de barrido</b> .....	35
<b>5.2. Ensayos microbiológicos</b> .....	36
<b>6. Conclusiones</b> .....	40
<b>7. Recomendaciones</b> .....	40
<b>8. Referencias</b> .....	41

Lista de Tablas

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas. ....37

## Lista de Figuras

Figura 1. Espectros de absorción de nanopartículas de: a) cobre y b) plata, sintetizadas utilizando 200 µL de extracto acuoso de <i>P. koidzumii</i> a 85°C. ....	24
Figura 2. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de [Cu <sup>2+</sup> ]:[Ag <sup>+</sup> ]: a) 1.5:0.5, b) 1:3, c) 0.5:1.5, utilizando 200 µL de extracto acuoso de hojas <i>P. koidzumii</i> a 85°C a un pH de 9. ....	25
Figura 3. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag con una relación molar de los iones metálicos [Cu <sup>2+</sup> ]:[Ag <sup>+</sup> ]:1:3, sintetizadas con diferentes volúmenes de extracto acuoso de hojas <i>P. koidzumii</i> a 85°C y un pH de 9 .....	26
Figura 4. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de [Cu <sup>2+</sup> ]:[Ag <sup>+</sup> ]:1:3, utilizando 200 µL de extracto acuoso de hojas <i>P. koidzumii</i> , con un pH de 9, tomando la muestra a diferentes temperaturas (25-90°C) .....	27
Figura 5. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de [Cu <sup>2+</sup> ]:[Ag <sup>+</sup> ]:1:3, utilizando 200 µL de extracto acuoso de hojas <i>P. koidzumii</i> , con un pH de 9, y agitación ultrasónica a 45 Hz durante 15 minutos. ....	29
Figura 6. Espectro FTIR representativo del extracto acuoso de las hojas de <i>P. koidzumii</i> (a), y de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de [Cu <sup>2+</sup> ]:[Ag <sup>+</sup> ]:1:3, utilizando 200 µL de extracto acuoso a un pH de 9, a una temperatura de 50°C con agitación ultrasónica a 45 Hz durante 15 minutos (b). ....	31
Figura 7. Potencial Z de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de [Cu <sup>2+</sup> ]:[Ag <sup>+</sup> ]:1:3, utilizando 200 µL de extracto acuoso a un pH de 9, a una temperatura de 50°C con agitación ultrasónica a 45 Hz durante 15 minutos. ....	33
Figura 8. Distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag. ....	34
Figura 9. Imagen de microscopia electrónica de transmisión de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con <i>P. koidzumii</i> .....	35
Figura 10. Análisis composicional por espectroscopia de energía dispersiva de Rayos X, de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con <i>P. koidzumii</i> .....	36
Figura 11. Fotografía de la placa para determinar la MIC y la prueba confirmatoria en agar de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con <i>P. koidzumii</i> contra <i>A. flavus</i> ..	39
Figura 12. Fotografía de la placa para determinar la MIC y la prueba confirmatoria en agar de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con <i>P. koidzumii</i> contra <i>F. verticillioides</i> .....	39



## Introducción

En el año 2018 la producción de maíz en México fue de 13.4 millones de toneladas y dadas las variaciones en los volúmenes de producción del grano, es necesario importarlo de otros países (SADER-SIAP, 2019), principalmente de Estados Unidos. A pesar de que el potencial productivo del maíz es mayor al consignado a las estadísticas de producción en México, una serie de factores adversos de naturaleza biótica y abiótica afectan de manera importante la producción. Se ha registrado la incidencia de hongos fitopatógenos que invaden el grano bajo condiciones favorables (campo o almacén), en el caso del grano de maíz destacan los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Penicillium*, mismos que pueden producir efectos nocivos en el cultivo y consumidores. Además, los tres géneros presentan especies productoras de micotoxinas. En México, el grano de maíz se destina principalmente para el consumo humano y animal, estudios realizados han mostrado que la presencia de estos hongos en el maíz destinado al consumo animal puede comprometer la palatabilidad y el valor nutrimental. Si el maíz es contaminado con especies productoras de micotoxinas pueden presentarse riesgos para salud en los animales debido a que estas sustancias pueden generar inmunosupresión, disminución de los índices productivos y en casos severos ocasionar la muerte. Diversas estrategias han sido empleadas para la prevención del crecimiento de los hongos y para la inactivación de micotoxinas; sin embargo, algunas de ellas son costosas, imprácticas, poco efectivas o inseguras, por tal motivo varias investigaciones se han enfocado al uso de la nanotecnología como una opción para el control de los hongos y de sus toxinas. Una parte importante en la nanotecnología es la referente a la síntesis de nanoestructuras en donde el control de su tamaño, forma y composición es la parte medular. Dentro de los diferentes métodos de síntesis; actualmente, la tendencia es la aplicación de los principios de la química verde utilizando alternativas con menor impacto al ambiente (extractos de plantas, hongos, levaduras, entre otros). Varios estudios han reportado que las nanopartículas de cobre y las nanopartículas de plata presentan actividad

antimicrobiana; sin embargo, poca información ha sido reportada para la aplicación de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag para el control de hongos de importancia en el grano de maíz destinado al consumo animal. Por lo anterior, el objetivo del trabajo propuesto fue sintetizar nanopartículas de Cu/Ag vía química verde y evaluar su efecto fungicida contra los hongos patógenos productores de micotoxinas *A.flavus* y *F. verticillioides* del maíz destinado al consumo animal.

## **1. Antecedentes**

### **1.1. La producción de maíz y su manejo poscosecha en México**

La Organización Mundial de las Naciones Unidas (ONU) predijo en el año 2005, que para el año 2050, la población humana será de aproximadamente 9.1 billones de personas. Se prevé que por la falta de materias primas y el desperdicio de comida no será posible cubrir el abasto alimenticio de toda la población (Tefera, 2012). Debido a esto, se deben enfocar las investigaciones en el área agroalimentaria, es una preocupación latente en el mundo actual. En los años 2010 y 2011 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) publicó una investigación realizada por el Instituto Sueco de Alimentos y Biotecnología (SIK) en donde se estimó que el 30% de los alimentos que se producen anualmente en el mundo se pierden o desechan, y van a parar a la basura aproximadamente 1300 millones de toneladas de alimentos, de las cuales 247 millones corresponden a los granos de cereales. En Latinoamérica las pérdidas se producen mayoritariamente en la etapa de consumo (28%), y en el manejo y almacenamiento (22%) de los productos (Gustavsson, *et al.* 2011). Esto indica que alrededor de 54.34 millones de toneladas de granos de cereales se pierden durante la fase de manejo y almacenamiento, pero este porcentaje no solamente se refieren al desperdicio, sino también a la pérdida de la calidad e inocuidad sanitaria. En México, el maíz (*Zea mays L.*), es uno de los granos que cobra mayor importancia económica, social y cultural. La producción de maíz se divide en blanco y amarillo, el maíz blanco representa el 86.94% de la producción nacional y se destina principalmente al consumo humano. El maíz amarillo es destinado al sector industrial y a la elaboración de alimentos balanceados para la producción. En México la producción de este producto sólo satisface el 24% de los requerimientos. Para el 2018, México se perfiló para ocupar el primer lugar como importador de maíz con 16 millones de toneladas. El principal proveedor de maíz es Estados Unidos.

La producción de grano de maíz durante el año 2017 fue de 27.7 millones de toneladas, aproximadamente el 60% de la producción total fue destinada a la alimentación humana y el resto para consumo animal y usos industriales (SAGARPA-SIAP, 2018).

El grano de maíz se cosecha durante todo el año en diversas condiciones climáticas (Méndez-Albores *et al.*, 2004). Se estima que el maíz producido e importado presenta pérdidas cercanas al 10% debido al manejo poscosecha inadecuado, permitiendo su colonización por diversos patógenos, afectando la economía de los productores (Quezada *et al.*, 2006). Entre las principales causas de estas pérdidas se encuentra la carencia de equipo técnico para realizar la limpieza y secado adecuado de los granos, la capacidad insuficiente de almacenamiento, entre otras. Por esta razón se han instalado a lo largo del país 2,755 centros de acopio de maíz con una capacidad para almacenar en total 37, 459 miles de toneladas; sin embargo, estos centros no tienen la capacidad suficiente para cubrir el valor total de producción e importación dentro del país (ASERCA, 2016).

Debido a que el grano de maíz es rico en almidón presenta más susceptibilidad a la contaminación por diversos microorganismos, los hongos son los principales agentes que suelen invadirlo durante su crecimiento en el campo, durante el transporte, y/o su almacenamiento (Méndez-Albores *et al.*, 2004), convirtiéndose en un problema de interés mundial para el sector productivo (Huwig *et al.*, 2001). La presencia de especies patógenas en el grano disminuye su valor comercial, y afecta la calidad nutrimental y sanitaria. Se ha reportado que cuando se destina como alimento en las unidades de producción animal puede ocasionar el rechazo del grano por parte de los animales, enfermedades, disminución en los índices de conversión alimenticia y en la ganancia de peso, inmunosupresión, alteración de la capacidad reproductiva y en casos severos ocasionar la muerte (Huwig *et al.*, 2001). Existen diversos géneros de hongos que pueden invadir el grano tanto en el campo como en el almacén, pero se ha reportado que los principales son *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.* y *Fusarium verticillioides* (Keller *et al.*, 2013).

## **1.2. La contaminación del maíz por *Aspergillus flavus*.**

El género *Aspergillus* es comúnmente encontrado como un patógeno contaminante en el maíz en condiciones de almacenamiento poscosecha. De todas las especies que se conocen del hongo *Aspergillus spp.* destacan: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, y *A. terreus* (Arenas Guzman, 2013). Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza; además, puede diseminarse fácil y ampliamente, ya que puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, el *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, un contenido de agua en el grano de entre 15 y 20 %, y un rango de temperatura amplio de 0 a 45 °C (Padrón *et al.*, 2013). Se ha reportado que la invasión del grano de maíz por este hongo disminuye el porcentaje de proteínas y el de lípidos, componentes que tienen una función importante en la alimentación animal, ya que ayuda a mantener las funciones metabólicas, y enzimáticas, entre otros. Por lo tanto, cuando el alimento contaminado es suministrado en la producción animal afecta directamente los parámetros productivos (Di Domenico *et al.*, 2015).

El *A. flavus* es responsable de la producción de una serie de sustancias altamente tóxicas denominadas aflatoxinas (Davis *et al.*, 1966) las cuales han sido clasificadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC) en el grupo 2A como probablemente cancerígeno (IARC, 1993), debido a lo anterior se han considerado como un problema de salud pública.

## **1.3. Aflatoxinas**

Como se mencionó anteriormente las aflatoxinas son un grupo de metabolitos procedentes del hongo *A. flavus*, los cuales causan grandes pérdidas en el sector de la producción animal. Las aflatoxinas fueron descubiertas en el año de 1960, a raíz de una crisis veterinaria en Inglaterra, cuando murieron alrededor de 100 000 pavos, al realizar la necropsia se encontró una severa inflamación intestinal, y necrosis hepática; y se atribuyó que el deceso de los animales fue causado por

estos metabolitos y fue denominada “enfermedad X de los pavos”. La toxina más abundante es la AFB<sub>1</sub>, la cual es metabolizada en el citocromo P450 dentro de los hepatocitos, el severo poder toxígeno se debe a que pueden formar un enlace covalente con el nitrógeno número siete dentro de la guanina en el DNA (Rushing *et al.*, 2018). El crecimiento de *Aspergillus flavus* y la contaminación del maíz con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el maíz y el ambiente. Esta interacción determina el grado de infestación, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas. En la producción animal, pueden ocasionar pérdidas económicas debido a la disminución de los parámetros productivos y en ocasiones la muerte de los animales, ya que el hígado es el órgano blanco principal cuando existe un problema de aflatoxicosis.

#### **1.4. La contaminación del maíz por *Fusarium verticillioides***

El género *F. verticillioides* es endémico del maíz, afectando la calidad nutricional y sanitaria, por lo que la contaminación con esta especie se da desde el campo, cuando el manejo poscosecha es inadecuado y también puede presentarse invasión en condiciones de almacenamiento. Comúnmente *F. verticillioides* afecta el pedículo del maíz (Wicklow *et al.*, 2005), lo que provoca la putrefacción del tallo, de la raíz y de la mazorca; además, genera productos tóxicos derivados de su metabolismo secundario denominados fumonisinas en el campo y en el almacén.

#### **1.5. Fumonisinas**

Las fumonisinas fueron aisladas y descritas por primera vez en 1988 en Sudáfrica; en el año de 1993 fueron clasificadas dentro del grupo 2B, posiblemente cancerígenas por la IARC; existen alrededor de 15 tipos de fumonisinas, la más tóxica es la FB<sub>1</sub>. El mecanismo de toxicidad consiste en bloquear la síntesis de los esfingolípidos, afectando las membranas celulares, principalmente de las neuronas, la FB<sub>1</sub> bloquea la ceramida sintasa, lo que genera acumulación de esfingosina y esfinganina m (Serrano-Coll *et al.*, 2015). Cuando se alimenta a los animales con maíz contaminado con dichas sustancias, se pueden presentar diversas enfermedades como leucoencefalomalacia (équidos), edema pulmonar (cerdos),

entre otros (Munkvold *et al.*, 1999). La contaminación del grano de maíz con hongos o sus micotoxinas reduce su valor en el mercado (Williams *et al.*, 2009), por esa razón se han desarrollado diversas estrategias para prevenir y/o controlar la invasión del grano de maíz con hongos y en consecuencia también se evita la formación de micotoxinas

### **1.6. Métodos para el control de los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides***

Varias son las estrategias que han sido empleadas para el control de hongos, tanto en el campo como en el almacén, las cuales incluyen métodos físicos (rotación de cultivos, densidad de siembra), químicos (fungicidas, uso de extractos de aceites esenciales con actividad antifúngica, fertilizantes) y biológicos (uso de especies resistentes a la contaminación de hongos), la mayoría de estos métodos utilizados en la etapa previa a la cosecha del maíz (Padrón *et al.*, 2013). En el caso de los métodos utilizados en el manejo poscosecha, el método más común utilizado es el control químico a través de la aplicación de fungicidas como el N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida (Captan); sin embargo, se ha reportado que el uso de este fungicida puede presentar problemas de fitotoxicidad y disminuir la calidad fisiológica y alterar el DNA de la semilla (Parra *et al.*, 2004, Moreno-Limón *et al.*, 2012)

Asimismo, diversos métodos han sido desarrollados para la descontaminación del grano de maíz de las micotoxinas, los cuales incluyen el uso de arcillas secuestrantes (Jouany *et al.*, 2007), ácidos orgánicos o soluciones electrolizadas de superoxidación para su inactivación (Jardon-Xicotencatl *et al.*, 2015), entre otras. Algunas de las desventajas de los métodos de descontaminación es que se utilizan productos que son costosos para el productor o que podrían llegar a ser tóxicos para los animales (Ezzeddine, 1999).

En la búsqueda de nuevas estrategias para prevenir el crecimiento de los hongos principalmente del género *A. flavus* y *F. verticillioides* en el grano de maíz se han desarrollado diversas investigaciones que se han enfocado a la creación de nuevos antimicrobianos, entre las propuestas más prometedoras y novedosas se encuentra

el uso de los materiales a escala nanométrica, ya que presentan diferentes propiedades ópticas, eléctricas, fotónicas, antimicrobianas, entre otras; en comparación con los materiales másicos. La ciencia encargada del estudio de los materiales, sus propiedades y aplicación a escala nanométrica es la nanotecnología.

### **1.7. Nanotecnología y métodos de síntesis de nanoestructuras**

La nanotecnología ha sido definida como la tecnología para el diseño, fabricación, y aplicación de materiales que incluye el entendimiento de las propiedades físicas y su relación con las dimensiones del material a escala nanométrica (Sinha *et al.*, 2017), en términos sencillos *nano* es un prefijo griego que significa “enano”. Un nanómetro equivale a  $10^{-9}$  metros, para alcanzar a visualizar lo pequeño que son los materiales a nanoescala se puede realizar una comparación donde el cabello humano mide alrededor de 80,000 nm, mientras que un glóbulo rojo puede llegar a medir 5,000 nanómetros (Silvestri *et al.*, 2014).

Al hablar de nanotecnología se debe mencionar obligatoriamente a Richard Feynmann (1918-1988) quien ha sido considerado como el padre de la nanotecnología debido a que él fue el primero en plantear la idea de la aplicación y la manipulación de los materiales a escala atómica. Feynmann durante su conferencia “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”(1959) mencionó lo siguiente: “En el mundo de lo muy, muy pequeño, muchas cosas nuevas podrán suceder, porque los átomos se comportan de manera distinta a como lo hacen los objetos a mayor escala, pues deben satisfacer las leyes de la mecánica cuántica. Si nos reducimos y comenzamos a jugar con los átomos allá abajo, estaremos sometidos a unas leyes diferentes, y podremos hacer cosas diferentes. A nivel atómico, aparecen nuevos tipos de fuerzas, nuevas posibilidades, nuevos efectos” (Freitas Jr *et al.*, 2005, Uribe *et al.*, 2007, Echevarría-Castillo, 2013); gracias a este planteamiento se abrió un mundo de posibilidades que revolucionarían la ciencia en más de un sentido, ya que en la actualidad se cuenta con las herramientas

necesarias como los microscopios electrónicos que brindan la posibilidad de analizar materiales nanométricos.

Dentro del área de la nanociencia y la nanotecnología una rama importante es la síntesis de nanoestructuras. En este sentido, los métodos de síntesis de estos materiales han sido agrupados en dos aproximaciones principales, las técnicas de *arriba hacia abajo (Top-down)* se enfocan en diseñar y miniaturizar el tamaño de estructuras (máscico) para obtener sistemas funcionales a nanoescala. Es decir, se inicia de los materiales a gran escala para llevarlos a una menor. Por ejemplo, el uso de la fotolitografía (técnica usada en la industria de los semiconductores para crear circuitos integrados en obleas de silicio), la nanolitografía (uso de electrones para imprimir patrones sobre resinas de algunos polímeros). Por otro lado, las técnicas de *abajo hacia arriba (Bottom up)* se centran en la construcción de estructuras y objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares. En este tipo de aproximación se busca sintetizar las nanoestructuras uniendo o manipulando átomos o moléculas. Las aproximaciones de abajo hacia arriba presentan mayor cantidad de beneficios en comparación con las técnicas arriba para abajo, por lo que ha sido acogida como el enfoque principal de la nanotecnología, ya que permite que los materiales puedan manipularse de manera más precisa; entre las principales ventajas de este método de síntesis sobre las técnicas *Top-Down*, se encuentra la posibilidad de obtener una composición química homogénea, no requerir equipos costosos para la síntesis de los nanomateriales, además de controlar el tamaño de la partícula, modificar o controlar la morfología, entre otros (Silva, 2004, Tan *et al.*, 2013).

Dentro de la aproximación de abajo hacia arriba, se han desarrollado diversas metodologías físicas y químicas para la síntesis de nanoestructuras. Dentro de los métodos físicos se destacan la ablación laser (Mafuné *et al.*, 2000), la radiólisis (Chitose *et al.*, 2003), entre otros. Sin embargo, estos métodos requieren de equipamiento sofisticado, de alto costo. La síntesis de nanoestructuras por métodos

químicos incluye el método sol-gel, el método de precipitación controlada, el de la reducción química, reacciones en estado sólido, entre otros.

La manipulación de los parámetros de síntesis ofrece la posibilidad de obtener diferentes tipos de nanoestructuras, las cuales han sido clasificadas en estructuras 0D, 1D, 2D, y 3D. Las nanoestructuras 0D son materiales en donde todas las dimensiones (x,y,z) se encuentran dentro de la escala nanométrica (1-100 nm), dentro de esta clasificación se encuentran las nanopartículas, los puntos cuánticos, los nanocristales y las nanoesferas. Las estructuras 1D tienen al menos una de su dimensión dentro de la escala nanométrica, ejemplo de ellas son los bastones, los nanoalambres, las nanofibras, los nanotubos, y nanoespinas. De las nanoestructuras 2D se incluyen las nanosábanas, nanolaminas y películas delgadas. Las estructuras 3D no tienen ninguna dimensión dentro de la escala nanométrica; sin embargo, las partículas primarias que las conforman se encuentran en la escala nanométrica. Los nanomateriales ofrecen un amplio espectro de nuevas posibilidades para diversas aplicaciones en áreas como en la medicina, la electrónica, la cosmética, la biológica, la alimentaria, o como agentes antimicrobianos.

Las nanopartículas presentan un área de superficie mucho mayor con respecto al volumen en comparación con los materiales másicos. La mayoría de las propiedades de los materiales a escala nanométrica dependen del tamaño, la morfología, la composición, y la estructura (Brumbaugh *et al.*, 2014). En general, una nanopartícula durante su formación atraviesa por dos fases, la nucleación y el crecimiento. Durante la nucleación los átomos del elemento se mueven aleatoriamente y chocan unos con otros para formar clusters, durante el crecimiento estos clusters incrementan su tamaño añadiendo más átomos del elemento hasta alcanzar un tamaño crítico, que es el punto en donde la nanopartícula se encuentra estable porque ha disminuido su energía superficial, cuando alcanza este estado la nanopartícula ya se encuentra formada. Para disminuir la energía superficial de las nanopartículas se han utilizado compuestos conocidos como estabilizantes que

entre otras cosas evitan la aglomeración de las nanopartículas, se ha reportado el uso de gomas, extractos de plantas, entre otros; además, se utilizan compuestos que se denominan reductores cuya función es ayudar a reducir los iones metálicos para disminuir el tamaño de las nanopartículas, se ha reportado el uso de ácidos orgánicos, algunos solventes, extractos de plantas, entre otros. (Tan *et al.*, 2013). Para sintetizar nanopartículas se utilizan elementos metálicos, no metálicos; en los últimos años las nanopartículas metálicas han atraído la atención debido a sus propiedades únicas ópticas, catalíticas, electrónicas y antimicrobianas (Kasthuri *et al.*, 2009, Tan *et al.*, 2013).

### **1.8. Nanopartículas metálicas.**

Las nanopartículas metálicas (Ag, Au, Cu) tienen posibles aplicaciones en diversas áreas, como la electrónica, cosmética, área de recubrimientos, biotecnología, entre otros. Por ejemplo, en los últimos años se han desarrollado recubrimientos con nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana para electrodomésticos, en la industria eléctrica se han utilizado para elaborar condensadores, también han tenido aplicaciones en el área de la salud, ya que algunas nanopartículas pueden ser funcionalizadas con anticuerpos para ayudar a diagnosticar enfermedades (Usman *et al.*, 2013). Se han utilizado diversos metales como precursores para sintetizar nanopartículas, por ejemplo, plata (Goyal *et al.*, 2017), cobre (Dobrovolný *et al.*, 2017), hierro (Peng *et al.*, 2006), paladio (Manikandan *et al.*, 2016), oro (Mortier *et al.*, 2006), entre otros.

Para la síntesis de nanopartículas metálicas, la reducción química de los iones metálicos en presencia de agentes estabilizantes es uno de los métodos más empleados por las ventajas que ofrece. Dentro de los compuestos reductores más usados destacan el borohidruro de sodio, la hidracina hidratada, el ácido ascórbico, citrato de sodio, etilenglicol, azúcares reductores, entre otros. Para la estabilización de las nanopartículas se han empleado agentes surfactantes con el bromuro de cetiltrimetilamonio, dodecil sulfato de sodio, polietilenglicol, entre otros. Algunos de

estos compuestos pueden representar un riesgo a la flora y fauna e impactar de manera importante el ambiente.

Debido a lo anterior, la tendencia es el desarrollo de nuevos métodos de síntesis a través de estrategias que disminuyan el impacto ambiental mediante la disminución de residuos tóxicos empleando los principios de la química verde.

### **1.8.1. Síntesis de nanopartículas metálicas vía química verde**

Desde que el humano se autodenomina como la especie dominante sobre el planeta ha generado un impacto que ha dañado en pequeña o gran medida el ecosistema; desde la revolución industrial este impacto se ha incrementado segundo a segundo con el nacimiento de nuevas industrias aunado a la globalización. Lo que ha provocado que la tendencia mundial está enfocada a reducir los residuos peligrosos, tomando como base los 12 principios fundamentales de la química verde (Sharma *et al.*, 2009). Los principios de la química verde fueron propuestos originalmente por Paul Anastas y John Warner en su libro “*Química verde, teoría y práctica*”, la aplicación de estas estrategias en la implementación de los procesos de síntesis de nanopartículas mediante rutas verdes, contribuirán a la sustentabilidad del planeta, la economía y el ambiente (Anastas *et al.*, 2010).

Los puntos de la química verde se centran en diversos principios entre los que destacan la prevención, economía atómica, uso de metodologías que generen productos con baja toxicidad, disminución del consumo energético, entre otros (Anastas *et al.*, 2001).

En la actualidad existe una gran diversidad de métodos reportados para la síntesis de nanopartículas metálicas denominados métodos verdes, utilizando como donadores de electrones para la reducción de los iones metálicos extractos de plantas (planta completa o partes de la planta), microorganismos, o compuestos químicos con baja toxicidad. Por ejemplo, algunos métodos han reportado como agentes reductores al citrato de sodio (Dong *et al.*, 2009), la goma arábiga (Medina-Ramirez *et al.*, 2009), el ácido ascórbico (Panigrahi *et al.*, 2004).

Siguiendo esta tendencia enfocada al uso de los principios de la química verde el campo de la nanotecnología ha utilizado polisacáridos provenientes de plantas, como por ejemplo las ciclodextrinas (oligosacáridos cíclicos que tienen un enlace de tipo covalente de tipo glucosídico), el almidón (polímeros ramificados de glucosa) entre otros (Zhao *et al.*, 2011). También se han utilizado algunos extractos de plantas como *Cinnamon zeylanicum* (Sathishkumar *et al.*, 2009), *Syzygium aromaticum* (Subhankari *et al.*, 2013), entre otros; en dichos estudios han encontrado que los compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de las plantas juegan un doble papel, como reductor y como agente estabilizante de las nanopartículas metálicas (cobre, plata, bimetálicas).

### **1.8.2. Nanopartículas bimetálicas**

Las nanopartículas bimetálicas se componen de dos metales diferentes (Toshima *et al.*, 1998), tienen inmersos en toda su matriz átomos de cada metal. Estas nanopartículas tienen un particular interés debido a que la unión de los dos metales les confiere a las partículas nuevas características en comparación con los elementos puros con nuevas propiedades eléctricas, ópticas, antimicrobianas y catalíticas (Valodkar *et al.*, 2011).

Las nanopartículas bimetálicas pueden presentar dos formas en que se encuentran acomodados los átomos metálicos, la aleación es una mezcla dispersa en donde toda la matriz se encuentra compuesta de átomos de ambos metales, y la conformación core/shell en donde todos los átomos del núcleo pertenecen a un metal y la capa externa de la partícula a otro. Una de las morfologías más buscadas es la conformación core/shell debido a las características antimicrobianas que presenta (Muzikansky *et al.*, 2013).

Existen varias metodologías propuestas para obtener las diferentes conformaciones morfológicas de las partículas, cuando durante la síntesis reaccionan ambos metales al mismo tiempo posiblemente se obtenga una aleación, mientras que cuando se utilizan semillas de algún metal la morfología que se puede obtener es de tipo core/shell (Tsuji *et al.*, 2010).

Se han utilizado diversas combinaciones de metales para la síntesis de las nanopartículas bimetálicas por ejemplo Pt-Fe, Au-Fe, Pd-Au, Cu-Au, Pd-Pt, Cu-Ag, entre otros (Yan *et al.*, 2010). Recientes investigaciones se han enfocado en la síntesis de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag debido a sus aplicaciones en diversas áreas, por ejemplo, en la industria de los conductores, el uso de plata tiene como obstáculo ser un material costoso, mientras que las nanopartículas de cobre se oxidan fácilmente, al combinar estos dos metales se evita la oxidación de las partículas, y se reducen costos (Kim *et al.*, 2014). En la industria alimentaria se ha reportado la utilización de nanopartículas bimetálicas en lugar de las nanopartículas monometálicas, con la finalidad de mejorar la actividad antimicrobiana de las películas contra bacterias como *Salmonella typhimorium* y *Lysteria monocytogenes* (Arfat *et al.*, 2017).

Para la síntesis de nanopartículas bimetálicas de plata/cobre se han utilizado el método de poliol obteniendo nanopartículas de tipo core/shell (Tsuji *et al.*, 2010), reducción química (Tan *et al.*, 2013), método de Pechini (Puente-Urbina *et al.*, 2012). En recientes investigaciones donde se han sintetizado nanopartículas bimetálicas usando extractos de hojas o frutos han reportado que es posible realizar este proceso teniendo como resultado productos amigables con el ambiente; además, de tener la ventaja de ser métodos económicos (Sheny *et al.*, 2011). Para desarrollar nanopartículas bimetálicas de Au-Ag se ha usado el extracto *Anacardium occidentale* (Sheny *et al.*, 2011) o *Potamogeton pectinatus L.* (AbdelHamid *et al.*, 2013), entre otros. Para el caso de las nanopartículas Cu/Ag para obtener una conformación de tipo core/shell se han utilizado compuestos derivados del almidón como las ciclodextrinas, entre otros (Zhao *et al.*, 2011).

Se ha reportado que las nanopartículas bimetálicas pueden ejercer un mayor efecto cuando son utilizadas como agentes antimicrobianos (Zain *et al.*, 2014), esta ventaja ha ofrecido muchas posibilidades para desarrollar nuevos tratamientos contra agentes patógenos (Marková *et al.*, 2013). Se ha reportado que las nanopartículas Ag/Cu contra agentes bacterianos como *B. subtilis*, y *E. coli* presentan un mayor

efecto bactericida en comparación de las nanopartículas monometálicas (Ag, Cu) debido a que para obtener la MIC (concentración mínima inhibitoria) se requiere una menor cantidad de mg/L (Zain *et al.*, 2014).

### **1.8.3. Actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas**

La nanotecnología ofrece un amplio espectro de nuevas posibilidades para la elaboración de nuevos materiales con propiedades antimicrobianas. Las nanopartículas metálicas han sido extensamente estudiadas, por sus propiedades antimicrobianas, en áreas tan diversas como la industria textil, aplicaciones con potencial médico, y en el tratamiento de aguas (Jain *et al.*, 2008).

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre y plata está bien establecida, en comparación con las nanopartículas bimetálicas, de las cuales existen pocos estudios sobre sus efectos antimicrobianos, pero parecen ser una promesa significativa para combatir la resistencia generada por los agentes patógenos (Valodkar *et al.*, 2011).

En diversas investigaciones se ha evaluado la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre. Se ha reportado que tienen efecto bactericida y fungicida contra agentes patógenos entre los que se puede citar: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* (Ramyadevi *et al.*, 2012), *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris* (Rai *et al.*, 2009, Gyawali *et al.*, 2011, Shalaka *et al.*, 2011, Ahamed *et al.*, 2014), por mencionar algunos.

Las nanopartículas al tener mayor área de superficie presentan una gran acción bactericida y fungicida, se ha propuesto que una vía de acción de las nanopartículas puede ser a través de la alteración de la permeabilidad de la membrana permitiendo el paso de agua, lo que genera productos tóxicos para los microorganismos como peróxido de hidrógeno, que provocan la lisis celular (Raffi *et al.*, 2010). Además se sugiere que las nanopartículas metálicas, generan especies reactivas de oxígeno,

que podrían provocar disfuncionalidad en el ADN, lípidos, y proteínas (León *et al.*,2017)

Diversos estudios han sido conducidos para evaluar la actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas principalmente de plata y de cobre; Zain *et al* (2014) reporta un método de síntesis de nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag mediante química verde utilizando quitosano y ácido ascórbico; Valodkar *et al* (2011) sintetizaron nanopartículas de plata utilizando almidón como agente estabilizante, y como agente reductor el ácido ascórbico. Además, se han utilizado extractos de plantas para la síntesis de nanopartículas de plata. Sin embargo, no existe información reportada para la síntesis de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag utilizando extracto acuoso de la planta *Pyracantha koidzumii*, la cual ha sido reportado que posee compuestos polifenólicos e hidrocoloides, como ha sido mencionado anteriormente estos compuestos pueden estabilizar y reducir las nanopartículas, además al realizar la síntesis con un extracto acuoso se disminuye el impacto ambiental que suele generar la síntesis tradicional de las nanopartículas. De igual manera no existe información relacionada sobre la aplicación de estas nanopartículas para el control de hongos de importancia en el grano de maíz destinado al consumo humano y/o animal. Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de la aleación de nanopartículas bimetálicas cobre/plata sintetizadas vía química verde utilizando extracto acuoso de la *Pyracantha koidzumii*, contra los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides*, microorganismos de gran interés en el sector agroalimentario.

## **2. Hipótesis**

Las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con algunos principios de la química verde tendrán efecto fungicida contra el hongo *A. flavus* y el hongo *F. verticillioides*.

### **3. Objetivo general**

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag sintetizadas con algunos principios de la química verde contra *A. flavus* y *F. verticillioides*, plagas en el grano de maíz destinado a la alimentación animal.

#### **3.1. Objetivos particulares.**

Sintetizar de las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag utilizando *Pyracantha koidzumii* como agente estabilizante y reductor.

Determinar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las nanopartículas sintetizadas mediante su caracterización por las técnicas de espectroscopia UV-Vis, microscopia electrónica de transmisión, espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, y potencial Z.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las nanopartículas sintetizadas sobre los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides*.

### **4. Materiales y métodos.**

Para evaluar el efecto fungicida de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag contra *A. flavus* y *F. verticillioides* se realizó la síntesis de nanopartículas bimetálicas; posteriormente, se realizó la caracterización de las nanopartículas y finalmente se evaluó a nivel *in vitro* la actividad fungicida de éstas.

#### **4.1. Materiales**

Los materiales utilizados para la síntesis de las nanopartículas bimetálicas de Cu-Ag fueron: nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), todos ellos grado reactivo (Sigma-Aldrich). Las hojas de *P. koidzumii* fueron recolectadas en el Jardín Botánico de la FES Cuautitlán, durante los meses de abril y mayo del 2016. Para evaluar la sensibilidad de los hongos se utilizaron los siguientes materiales: caldo dextrosa Sabouraud (Digerido enzimático de caseína 5

g, digerido enzimático de tejido animal 5 g, dextrosa 20 g), Agar dextrosa Sabouraud (Peptona Micológica 10 g, Dextrosa 40 g, Agar 15 g) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El antifúngico utilizado como control positivo fue anfotericina B. En todo el experimento se utilizó agua desionizada como disolvente. Los hongos *Aspergillus flavus* Link (UNIGRAS-1231) y *Fusarium verticillioides* (UNIGRAS-2509) fueron obtenidos del cepario de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán, estos fueron aislados de maíz contaminado.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Preparación del extracto acuoso de *P. koidzumii***

Para la elaboración del extracto acuoso de *P. koidzumii* se recolectaron 100 g de hojas, las cuales fueron lavadas con agua desionizada para eliminar materia extraña y polvo, posteriormente se secaron en un horno a 40°C por 2 horas. Para preparar el extracto se realizó una suspensión de 10 g de hojas finamente cortadas en 100 mL de agua desionizada, la cual se llevó a ebullición durante 5 minutos con agitación constante. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 12 horas, se filtró con papel Whatman No. 1, y el filtrado fue envasado en un frasco de color ámbar y se almacenó a 4°C para su posterior uso.

### **4.2.2. Síntesis de nanopartículas bimetálicas (Cu/Ag)**

Para establecer las mejores condiciones de síntesis y asegurar la formación de nanopartículas bimetálicas de Cu:Ag, se evaluó el efecto de la relación de la concentración de las sales precursoras, utilizando como referencia la metodología empleada por Valodkar *et al* (2011). La relación utilizada fue Cu:Ag (1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1), del volumen de extracto acuoso de *P. koidzumii* empleado (50, 100, 150, 200, 250, y 300 µL), la temperatura de reacción (30, 60, 85 y 90 °C). La síntesis de las nanopartículas bimetálicas se realizó preparando 5 mL de una solución 1 mM de cada una de las sales precursoras (CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>), a la cual se ajustó el pH a

un valor de 9.0 con la adición de NaOH, enseguida se adicionaron 200  $\mu$ L del extracto acuoso de *P. koidzumii* y la mezcla se sometió a ultrasonido a un 100% de potencia, a una frecuencia de 45Hz a 50°C durante 15 minutos. Las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag fueron lavadas con ciclos de centrifugado (5000 rpm durante 5 minutos) y resuspendidas en agua desionizada, el proceso se realizó por triplicado.

#### **4.2.3. Caracterización de las nanopartículas bimetálicas Cu-Ag**

##### **4.2.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis**

La espectroscopia UV-Vis es una herramienta poderosa para la caracterización de las nanopartículas metálicas, esta técnica determina el plasmón de resonancia superficial (PRS) en las nanopartículas, el cual es un efecto físico de la absorción de la luz, esta característica óptica, es un efecto presente solamente en partículas de escala nanométrica, por lo tanto, está ausente tanto en los átomos individuales como en los materiales másicos (Belmares-Perales *et al.*, 2013). Se ha reportado que las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag presentan un plasmón en longitudes de onda alrededor de los 490-550 nm (Valodkar *et al.*, 2011). La obtención del espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas bimetálicas se determinó utilizando un espectrofotómetro marca Agilent Technologies modelo Cary 8454 UV-NIR de un solo haz con detector de diodos. Para tal efecto se tomó una alícuota de la muestra y se diluyó con agua desionizada y el rango utilizado fue de 200 a 1000 nm. Como referencia se utilizó agua desionizada.

##### **4.2.3.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier**

Esta espectroscopia es una de las herramientas más comunes para el análisis de los grupos funcionales presentes en una molécula, y puede ser empleada para el análisis de líquidos, sólidos y gases. La técnica se utilizó para tratar de elucidar la posible interacción de los principales grupos funcionales de los compuestos fitoquímicos que podrían ser responsables de la estabilización y de la reducción de

las nanopartículas bimetálicas. Las muestras fueron analizadas por el método de Reflectancia Total Atenuada (ATR) utilizando un espectrofotómetro Frontier SP 8000 Perkin Elmer. La dispersión de las nanopartículas se colocó en el aditamento del ATR y el espectro se determinó en un rango de número de onda de los 400 a los 4000  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 32 barridos (Philip, 2010).

#### **4.2.3.3. Potencial Zeta y dispersión dinámica de luz**

Las características de la superficie de la partícula y su carga juegan un papel importante en el estado físico, la estabilidad en diferentes medios, la tendencia a la aglomeración, y la interacción con otros sistemas. La evaluación del potencial zeta provee una medición indirecta de la carga. Para la determinación del potencial zeta se aplica un campo eléctrico a través de la muestra y el movimiento de las partículas (movilidad electroforética) es medida por la dispersión de la luz. El análisis del potencial zeta de las muestras se realizó en un equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) a temperatura ambiente. Para la medición del potencial zeta se utilizó una celda capilar plegable con electrodos. La muestra se preparó colocando dentro de cada una de las celdas 200  $\mu\text{L}$  de la solución de nanopartículas, re-suspendiendo con 3 mL de agua desionizada.

El tamaño de la partícula es una de las características físicas que más influye en las propiedades ópticas, catalíticas, y su aplicación está estrechamente relacionada con su dimensión. Varias son las técnicas que han sido empleadas para determinar el tamaño de las partículas, la técnica más empleada para determinar el tamaño de las nanopartículas es la dispersión dinámica de luz, el tamaño es determinado por la variación de la intensidad de la dispersión de la luz debido al movimiento Browniano de las partículas. La luz láser al interactuar con las partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones, si se determina en una sola dirección, los haces dispersados por diferentes partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad determinada, debido al movimiento browniano, las partículas se mueven constantemente y provoca cambios en la intensidad de la

dispersión. Entre más pequeñas sean las partículas mayor movimiento, mayor variación en la intensidad de la dispersión (Zavala-Franco *et al.*, 2018).

#### **4.2.3.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM) – EDS acoplado**

La microscopia electrónica de barrido es una técnica muy versátil utilizada para el análisis de la superficie que permite el estudio de la morfología (tamaño y forma) y de la composición de varios materiales. Su resolución lateral es de 1-10 nm, y a diferencia del TEM, no requiere de preparación elaborada de las muestras. La morfología de las nanopartículas fue evaluada con SEM, con la cual se puede obtener información de la homogeneidad. Adicionalmente, se realizó un análisis químico por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X. Las nanopartículas bimetálicas fueron analizadas con un equipo de microanálisis con la microsonda electrónica JEOL (EPMA) JXA - 8530F con espectroscopia de energía dispersiva (EDS). Las muestras para el SEM se prepararon dejando evaporar una gota de la suspensión coloidal de nanopartículas sobre una oblea de silicio (Zavala-Franco *et al.*, 2018).

#### **4.2.4. Ensayos microbiológicos.**

##### **4.2.4.1. Determinación de la MIC de nanopartículas bimetálicas mediante el método de microdilución.**

En la técnica de microdilución se utilizó caldo dextrosa Sabourad (CDS) ajustado a pH  $7 \pm 0.1$ . El inóculo fue preparado a partir de un cultivo de 7 días de crecimiento a 25 °C en agar dextrosa Sabouraud (SDA). Para *F. verticillioides* se utilizó un cultivo de 48 a 72 h a 35 °C y posteriormente a 25-28 °C hasta completar siete días, en SDA. En cada ensayo se depositó la misma cantidad de inóculo, para ello se sembraron 100 µl de una dilución 1/100 del inóculo en SDA incubado a 28-30 °C hasta que se observó la presencia de colonias (40-50 h para la mayoría de los hongos,  $0.4 - 4.0 \times 10^6$  UFC/mL). El inóculo se preparó tomando esporas pertenecientes a 5 colonias ( $\geq 1$  mm) con al menos 24 h de crecimiento en placas

de SDA. Las esporas fueron resuspendidas en un tubo de solución salina estéril (NaCl 0.85%), se tomaron 20 µL del inóculo para realizar el conteo en cámara de Neubauer, ajustando una concentración de  $2-5 \times 10^6$  conidias/mL. El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Numero de conidias/mL} = \frac{(\text{No. de conidias contadas})(1000)(20)}{0.4}$$

A partir de la solución stock de las nanopartículas bimetálicas, se realizaron diluciones dobles seriadas según el documento M-27 del Clinical Lab Standards Institute (CLSI, 2016). De cada una de las diluciones se tomaron 100 µL y se colocarán en los pozos del 1 al 10 (1.6 µg/mL - 0.31 µg/mL) de las placas de 96 pozos estériles, en la fila 12 se colocó el control de crecimiento que contenía 100 µL de medio CDS más 100 µL del inóculo, la fila 11 contenía el control de esterilidad con 200 µL de CDS. En la misma placa se colocaron testigos que corresponden a las nanopartículas de cobre sintetizadas vía química tradicional y plata sintetizadas vía química verde. Finalmente, la placa fue inoculada con 100 µL del inóculo a excepción del pozo 11. La placa fue incubada a 25°C sin agitación hasta que se observó crecimiento en el pozo control (entre 40 a 50 h), para determinar la MIC se observó el pozo en donde existió inhibición de crecimiento con la mínima dosis de antifúngico a probar (CLSI, 2016).

#### **4.2.4.2. Prueba confirmatoria de la MIC de nanopartículas bimetálicas**

Para realizar la prueba confirmatoria de la MIC de las nanopartículas bimetálicas, se preparó SDA, en el cual se colocó una gota con la concentración indicada de nanopartículas bimetálicas, la cual se dejó evaporar para dejar las nanopartículas depositadas sobre el agar. Posteriormente en donde se había depositado la gota con la concentración de nanopartículas obtenidas en la MIC, se inoculó mediante puntos separados los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides*, se observó el crecimiento a las 24 y 48 horas (Ramirez *et al.* 2009).

## **5. Resultados y discusión.**

### **5.1. Optimización de la condiciones de síntesis y caracterización de las nanopartículas bimetálicas Cu-Ag**

#### **5.1.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis**

En la Figura 1 se presentan los espectros de absorción de las nanopartículas de cobre y de las nanopartículas de plata sintetizadas con 200  $\mu$ L del extracto acuoso de *P. koidzumii*, utilizando una concentración de sales precursoras de 1 mM y pH de 9. Bajo las condiciones de síntesis empleadas no fue posible obtener nanopartículas de cobre, ya que no se presenta el plasmon característico de estas (curva a) reportado en la literatura, alrededor de los 580 nm, lo que indica que el extracto no fue efectivo para lograr la reducción de los iones de cobre. Por otro lado, el pico máximo de absorción para las nanopartículas de plata se presentó a los 410 nm, indicando que el extracto acuoso de la *P. koidzumii* tiene la capacidad de reducir los iones de plata. Pocos estudios se han realizado para la síntesis de nanopartículas de cobre utilizando extractos acuosos de plantas por el gran reto que suponen para la reducción de iones metálicos y la prevención de la oxidación del cobre para formar nanopartículas de CuO.

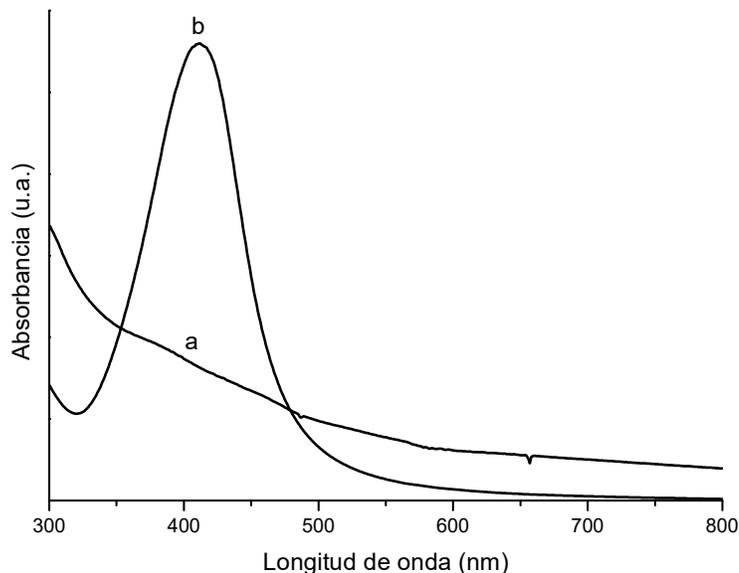


Figura 13. Espectros de absorción de nanopartículas de: a) cobre y b) plata, sintetizadas utilizando 200  $\mu\text{L}$  de extracto acuoso de *P. koidzumii* a  $85^\circ\text{C}$ .

Se ha reportado que la relación molar entre  $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{Ag}^+]$  es un factor determinante para la formación de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag debido a que los átomos de Cu son consumidos durante la reducción de los iones de plata según el siguiente mecanismo de reacción:



En la Figura 2 se presentan los espectros de absorción UV-Vis representativos de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas, variando las concentraciones molares de los iones metálicos. En la curva a que corresponde a la relación 1.5:0.5  $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{Ag}^+]$ , no fue posible visualizar el plasmon de las nanopartículas bimetálicas, indicando que bajo las condiciones de síntesis empleados no se formaron las partículas. Sin embargo, con las relaciones molares de 0.5:1.5 y 1:3, el pico máximo de absorción se presentó a los 450 nm. Volodkar *et al.*, (2011) reportaron que el

plasmon para las nanopartículas bimetálicas de Cu-Ag se encontró a longitudes de onda entre el plasmon de las nanopartículas de plata (420 nm) y el plasmon de las nanopartículas de cobre (580 nm), alrededor de los 455 nm, cuyos resultados coinciden con los encontrados en este trabajo. Al utilizar la relación de 1:3 de  $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{Ag}^+]$  se observa una mayor concentración de nanopartículas bimetálicas de Cu-Ag (curva c), al presentar el plasmon una intensidad relativa mayor a las encontradas para las otras relaciones empleadas en la síntesis. Adicionalmente, el plasmon reportado alrededor de los 450 nm, otros autores han observado la presencia de los plasmones en los espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas de Cu-Ag, uno a los 400 nm y otro alrededor de los 580 nm, plasmones característicos para las nanopartículas de plata y para las nanopartículas de cobre, lo que podría indicar la formación de nanopartículas monometálicas (Tsuji *et al.*, 2009).

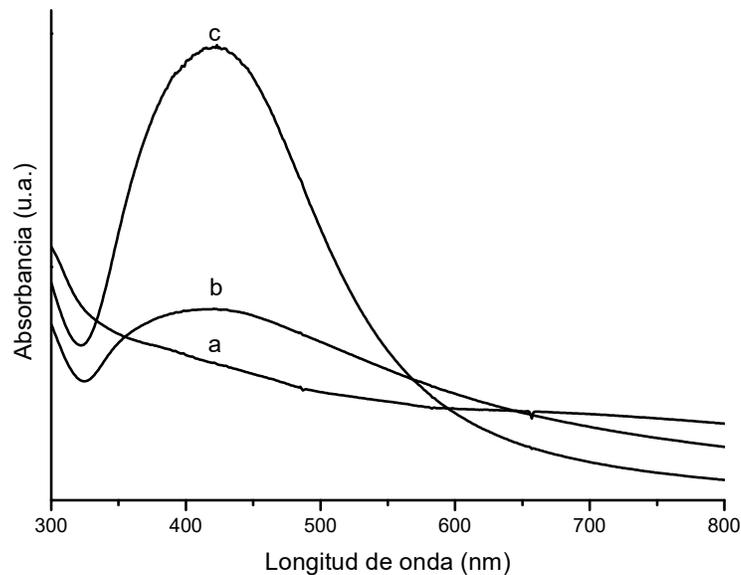


Figura 14. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de  $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{Ag}^+]$ : a) 1.5:0.5, b) 1:3, c) 0.5:1.5, utilizando 200  $\mu\text{L}$  de extracto acuoso de hojas *P. koidzumii* a 85°C a un pH de 9.

En la Figura 3 se presentan los espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas empleando diferentes volúmenes de extracto acuoso de *P. koidzumii*, después de 1 hora de reacción a 85 °C. Las nanopartículas sintetizadas presentan un plasmon intenso característico para este tipo de partículas, centrado alrededor de los 450 nm. Sin embargo, la intensidad relativa máximo de absorción fue mayor al incrementar el volumen del extracto en la reacción. También se observó un corrimiento del plasmon a longitudes de onda más pequeñas al incrementar el volumen (300  $\mu$ L), lo que podría indicar una disminución en el tamaño de la partícula o la formación de nanopartículas de plata. Con un volumen de 200  $\mu$ L el plasmon de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag presenta su máximo de absorción a los 450 nm y con la forma característica reportada para este material.

En estudios realizados para la síntesis de nanopartículas de cobre encontraron que el tamaño de partícula estuvo en función de la concentración del extracto de hojas de magnolia, con tamaños menores con extractos al 20 % en concentración en comparación con extractos al 15% (Lee *et al.* 2011).

La formación de las nanopartículas bimetálicas también fue monitoreada por espectroscopia de absorción UV-Vis en función de la temperatura de reacción. En la Figura 4 se presentan los espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas bimetálicas sintetizadas. Al incrementarse la temperatura de reacción se observa un incremento en la intensidad del plasmon, con forma ancha, cuyas longitudes de onda van desde 420-490 nm. Un incremento en la intensidad del pico es indicativo de un incremento en el número de partículas.

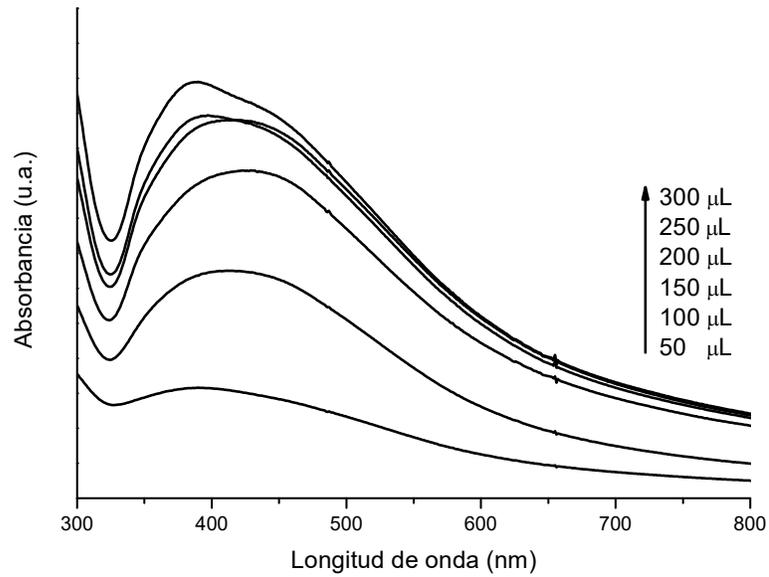


Figura 15. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag con una relación molar de los iones metálicos  $[Cu^{2+}]:[Ag^+]:1:3$ , sintetizadas con diferentes volúmenes de extracto acuoso de hojas *P. koidzumii* a  $85^{\circ}C$  y un pH de 9.

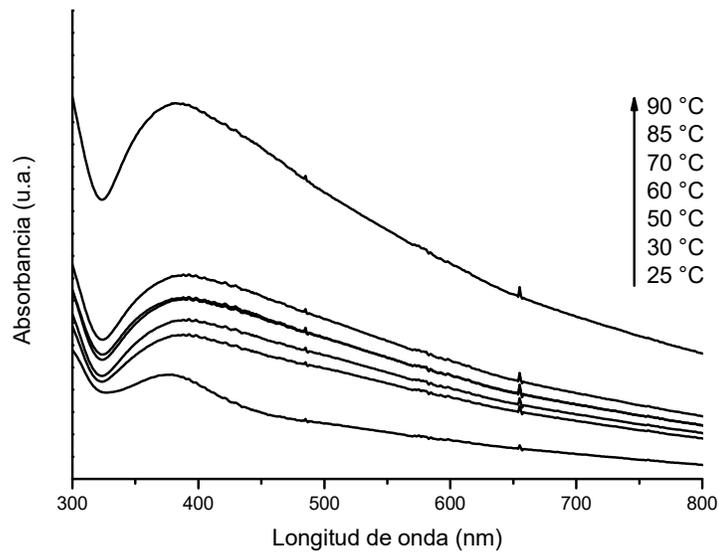


Figura 16. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de  $[Cu^{2+}]:[Ag^+]:1:3$ , utilizando  $200\ \mu L$  de extracto acuoso de hojas *P. koidzumii*, con un pH de 9, tomando la muestra a diferentes temperaturas ( $25-90^{\circ}C$ )

En la Figura 5 se presenta el espectro de absorción UV-Vis representativo de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de iones metálicos  $[Cu^{2+}]:[Ag^+]$  de 1:3, a un pH de 9, con 200  $\mu$ L de extracto acuoso de hojas de *P. koidzumii* a una temperatura de 50°C y en un baño ultrasónico con una potencia del 100% y frecuencia de 45 Hz durante 15 minutos, estas condiciones las que se emplearon para la síntesis de las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag en las pruebas microbiológicas. Dentro de la Figura 5 se presenta una imagen del color rojizo- café que adquieren las nanopartículas bimetálicas después de su formación. Se ha reportado que para este tipo de nanopartículas los colores de la suspensión pueden presentarse desde el rojo naranja hasta el morado, dependiendo de los parámetros de reacción.

Zhao *et al* (2011) sintetizó nanopartículas bimetálicas core-shell Cu/Ag, cuyo espectro de absorción UV-Vis presentó un plasmón desde los 400 hasta los 700 sin presentar un decaimiento, los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los encontrados por estos autores.

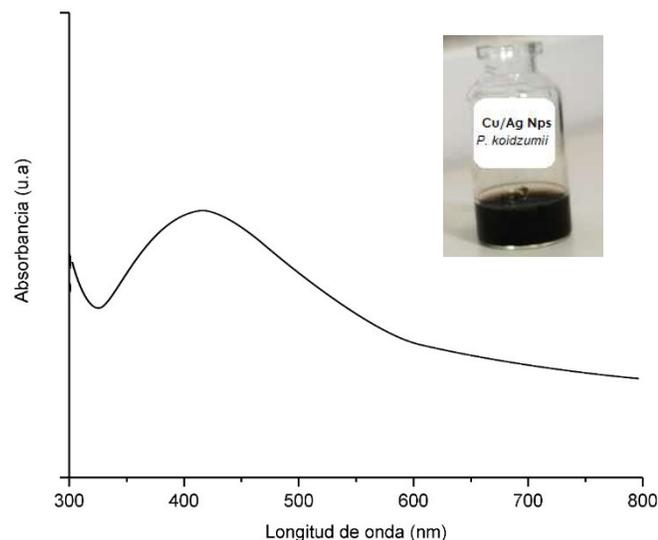


Figura 17. Espectros de absorción de nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de  $[Cu^{2+}]:[Ag^{+}]:1:3$ , utilizando  $200 \mu L$  de extracto acuoso de hojas *P. koidzumii*, con un pH de 9, y agitación ultrasónica a 45 Hz durante 15 minutos.

### 5.1.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier ha resultado ser una herramienta poderosa para determinar los cambios estructurales e interacciones intermoleculares entre los compuestos químicos presentes en extractos acuosos de plantas y la superficie de las nanopartículas por la modificación del espectro. En este trabajo la técnica fue empleada con el objetivo de tratar de elucidar los grupos funcionales presentes en mayor concentración en el extracto acuoso de las hojas de la *P. koidzumii* y su posible interacción con la superficie de las nanopartículas bimetálicas sintetizadas para efectos de estabilización. En la Figura 6, se presentan los espectros FTIR del extracto acuoso (curva a) y de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag en suspensión (curva b). En general, las bandas por debajo de  $1000 \text{ cm}^{-1}$  son atribuidas a impresiones digitales características del esqueleto de la molécula C-O-C, la región entre  $1000$  y  $1100 \text{ cm}^{-1}$  se debe al estiramiento del grupo C-OH,

las regiones de 1250 -1400  $\text{cm}^{-1}$  se obtienen bandas atribuidas al estiramiento de los enlaces C-O (Leite *et al.*, 2013). Al analizar el espectro se observan diferentes bandas características de los grupos funcionales que se están uniendo a las nanopartículas. Zavala-Franco *et al.* (2018), analizaron la biomasa de las hojas de la *P. koidzumii* mediante espectroscopia FTIR, en donde encontraron diferentes bandas características de esta planta que se observaron en el espectro mostrado en la Figura 6. La banda de 1441  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a carbonos de tipo  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  con enlace no simétrico que se puede encontrar dentro de algunas proteínas y lípidos; la banda de 1243 y 1091  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al  $\text{PO}_2$  que puede encontrarse dentro de la estructura de los ácidos nucleicos y algunas proteínas fosforiladas; la banda de los 1159  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al enlace C-O, C-OH, correspondiente de algunos carbohidratos. Las bandas a 1219  $\text{cm}^{-1}$  (polioles) y 1109 (Fenoles) se hizo más débil en la síntesis de nanopartículas, indicando que los polioles tenían función reductora del cobre y plata. Al comparar el espectro obtenido con el de las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag se observa que los picos de estas bandas se encuentran disminuidos o han desaparecido, por lo que puede indicar que las proteínas, polifenoles y algunos carbohidratos pueden ser los responsables de la reducción y estabilización de las nanopartículas. Neira (2015) en su trabajo de investigación menciona que los polifenoles presentes en los extractos de plantas pueden ser los responsables de la reducción de los iones metálicos, los cuales tienen como elemento central al fenol, el cual es un compuesto cíclico de 6 carbonos y grupos alcohol en su estructura; dentro de la investigación que realizó, encontró que las bandas correspondientes a los enlaces de carbono y alcoholes se encuentran disminuidos por lo que esto podría ser un indicativo de que los compuestos polifenólicos actúan como agente estabilizante y como reductor.

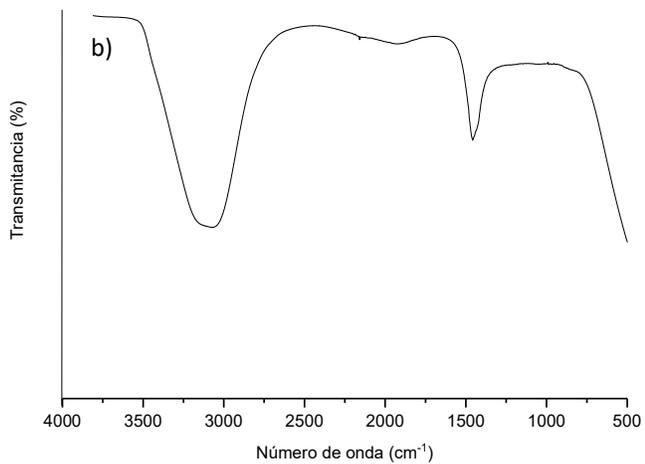
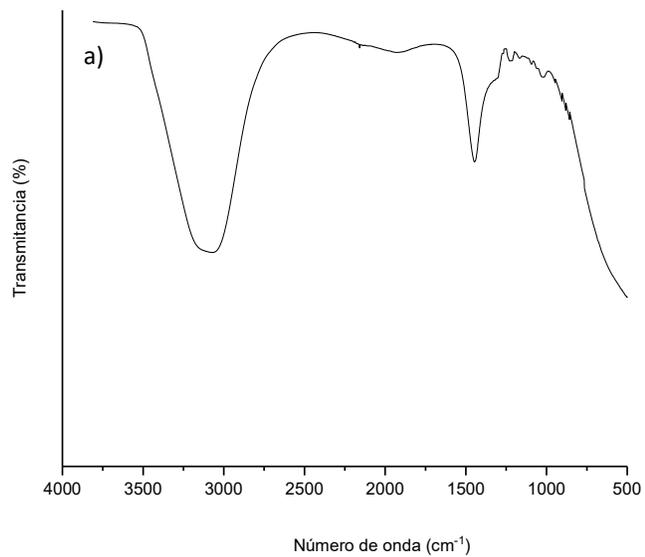


Figura 18. Espectro FTIR representativo del extracto acuoso de las hojas de *P. koidzumii* (a), y de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de  $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{Ag}^+]:1:3$ , utilizando 200  $\mu\text{L}$  de extracto acuoso a un pH de 9, a una temperatura de 50°C con agitación ultrasónica a 45 Hz durante 15 minutos (b).

### 5.1.3. Potencial zeta y dispersión dinámica de luz

En la Figura 7 se presenta la gráfica del potencial Z obtenido para las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag. El valor registrado fue de -23.7 mV lo que indica que la superficie de la partícula está cargada negativamente, entre más negativo o positivo sea el valor indica la estabilidad electrostática de la partícula, lo cual evita que las nanopartículas se aglomeren perdiendo así su particularidad de tamaño nanométrico. El conocer el signo de la carga superficial de las nanopartículas tiene importancia en el proceso de interacción de estas con los microorganismos como los hongos. Dubey *et al.*, 2010 reportan valores del potencial Z en un rango de -12 mV a -30 mV para las nanopartículas de plata, y de -13 a -33 mV para las nanopartículas de oro; sintetizadas empleando extractos acuosos de *Rosa rugosa*. Los resultados obtenidos en este trabajo están dentro del intervalo de valores de potencial Z reportado por estos autores. Otro parámetro importante en la determinación del valor del potencial Z, es el pH, por lo que estudios realizados por Goyal *et al.*, 2017, en donde evaluaron el efecto del pH en el valor del potencial Z de las nanopartículas de plata sintetizadas con beta glucanos, encontraron que a valores de pH 8.6 el potencial Z fue de -12 mV, mientras que a valores de pH de 10.3 el potencial Z se incrementó hasta -30.5 eV. Utilizando esto como referencia y al compararlo con los resultados, el valor de pH final después de las síntesis fue de 9, recordando que a ese valor la concentración de OH es mucho mayor, por lo que las cargas negativas presentes dan el valor de -23.7.

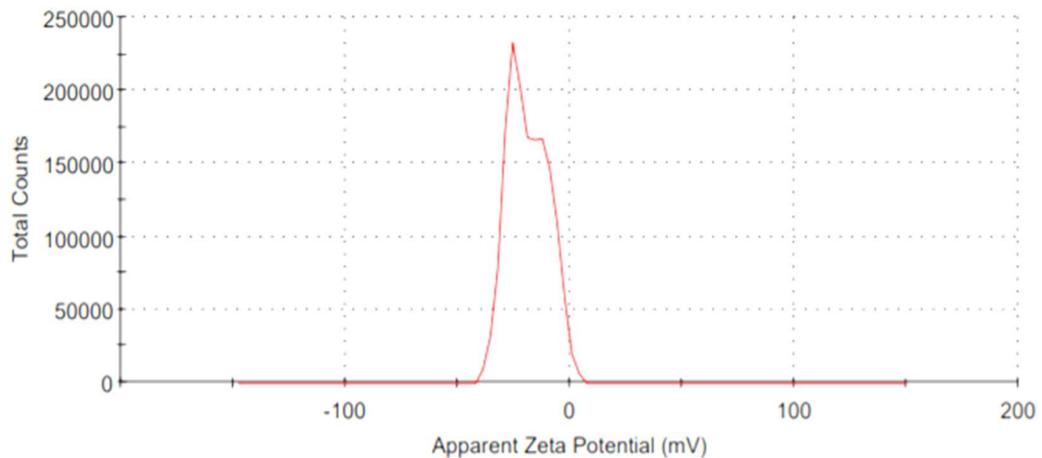


Figura 19. Potencial Z de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con una relación molar de  $[Cu^{2+}]:[Ag^{+}]:1:3$ , utilizando 200  $\mu\text{L}$  de extracto acuoso a un pH de 9, a una temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  con agitación ultrasónica a 45 Hz durante 15 minutos.

En la Figura 8 se presenta la distribución de tamaño de partícula obtenido por DLS, a través de la medición del radio hidrodinámico, en el cual se observa que el tamaño promedio de las partículas fue de 107.4 nm, y un índice de polidispersión de 0.304. Una sola distribución de tamaño nos indica que las nanopartículas bimetálicas presentan un tamaño uniforme. Diversos autores que han realizado la síntesis de nanopartículas bimetálicas de cobre/plata han encontrado diversos tamaños recordando que para que las nanopartículas sean consideradas como tales deben tener un tamaño menor a los 100 nm. Valodkar *et al* (2010) obtuvieron tamaños de partícula de aproximadamente 50 nm, al compararlos con los resultados encontramos que la media de las nanopartículas es de 107 nm, el radio hidrodinámico solo es un tamaño aproximado de la partícula, para confirmar el tamaño real se deben utilizar microscopía electrónica de transmisión.

## Results

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 107.4	<b>Peak 1:</b> 157.7	100.0	74.15
<b>Pdl:</b> 0.304	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.882	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

**Result quality :** Good

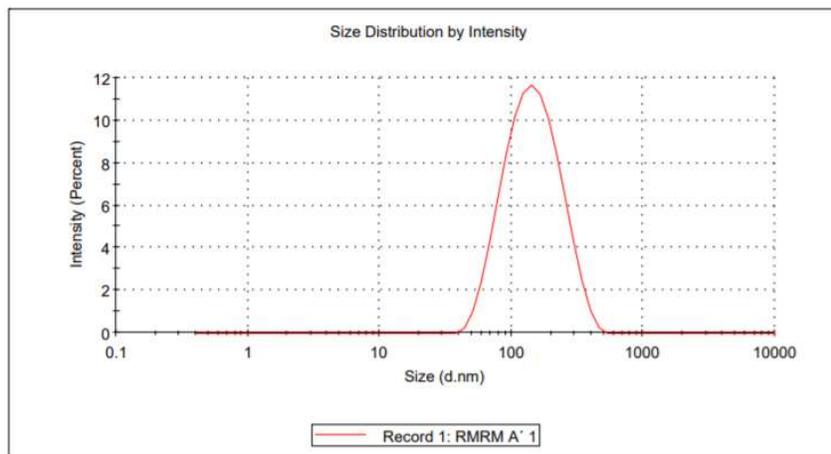


Figura 20. Distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag.

### 5.1.4. Microscopia electrónica de transmisión

En la Figura 9 se puede observar la caracterización de las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag por TEM en donde se observa que la morfología y el tamaño de las nanopartículas oscilo desde los 12 hasta los 65 nm. Adicionalmente, se puede observar una diferencia en la densidad de claroscuros de las partículas, lo que indica la naturaleza bimetálica de las partículas sintetizadas. Para corroborar la composición bimetálica se realizó el análisis de las nanopartículas mediante microscopia electrónica de barrido y análisis composicional por energía dispersiva de rayos X.

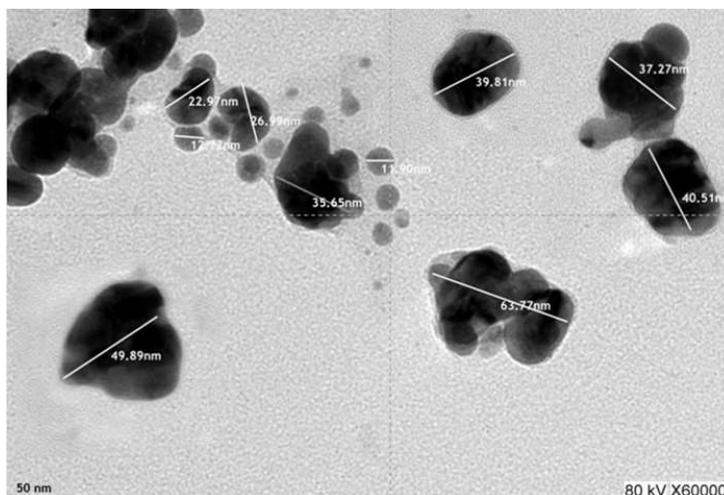


Figura 21. Imagen de microscopia electrónica de transmisión de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con *P.koidzumii*

#### 5.1.5. Microscopia electrónica de barrido

Adicionalmente, a la caracterización de las nanopartículas bimetálicas por TEM, se caracterizaron por microscopia electrónica de barrido. En la Figura 10 se presenta una imagen representativa de las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag, en la cual se observa una morfología esférica, distribución y tamaño homogéneos. Para confirmar la naturaleza bimetálica se realizó un análisis con espectroscopia de energía dispersiva de rayos X. Se encontró que las nanopartículas están formadas en un 65% de plata y un 35% de cobre, lo que confirma que el extracto acuoso de las hojas de la *P. koidzumii* tuvo la capacidad de reducir los iones metálicos y actuar como estabilizante al mismo tiempo. Tsuji *et al* (2010) sintetizaron nanopartículas bimetálicas mediante el método de poliol, quienes obtuvieron nanopartículas tienen un tamaño de  $94 \pm 28$  nm, y al analizarlas por EDS encontraron una conformación tipo core/shell teniendo como núcleo las de plata y una capa de cobre, al comparar las nanopartículas sintetizadas en este trabajo, el tamaño es menor y tienen una conformación de core/shell, haciendo nuestra metodología reportada una alternativa para la síntesis de nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag. Estos resultados resaltan el papel preponderante que tiene el extracto acuoso de la *P. koidzumii* para la estabilización de las nanopartículas y prevenir su aglomeración.

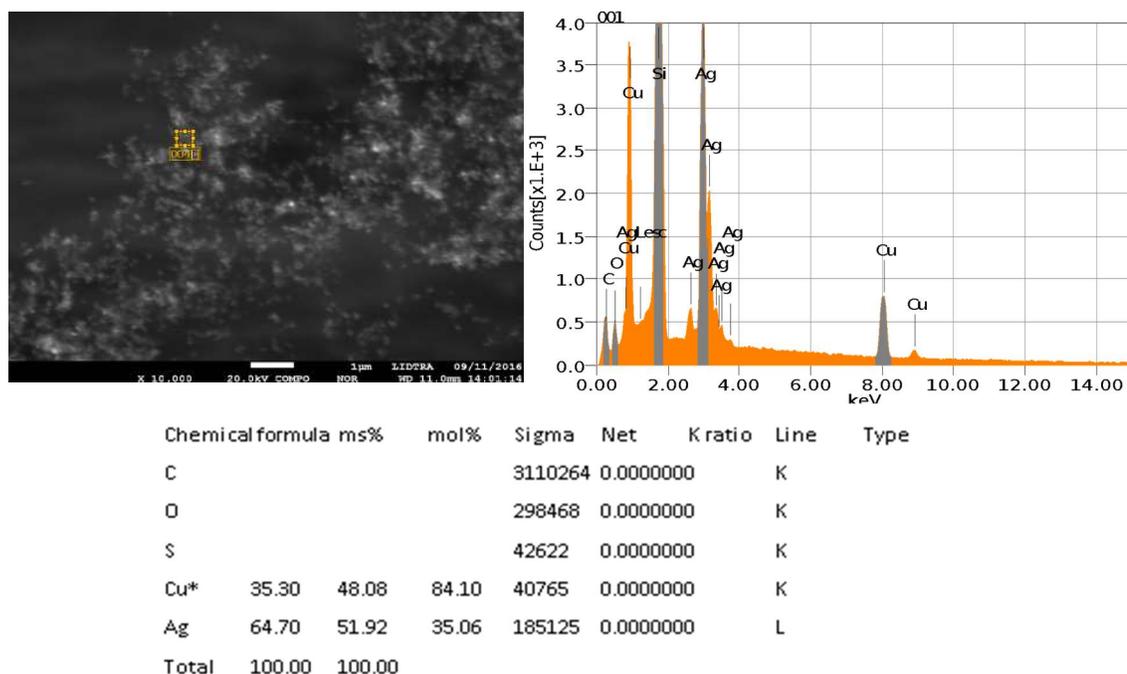


Figura 22. Análisis composicional por espectroscopia de energía dispersiva de Rayos X, de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con *P. koidzumii*

## 5.2. Ensayos microbiológicos

La actividad antifúngica de las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag se determinó utilizando el método de microdilución en placa, utilizando como control positivo la Anfotericina B. En la tabla 1 se presentan los datos de la concentración mínima inhibitoria para los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides*, microorganismos de interés en el sector agropecuario. La concentración mínima inhibitoria para el hongo, *A. flavus* fue de 12  $\mu\text{g/mL}$ , y para el hongo *F. verticillioides* fue de 6.25  $\mu\text{g/mL}$  al exponerlos a la Anfotericina B. Los resultados obtenidos son relativamente altos comparados con los reportados en la literatura. Esto puede deberse a la naturaleza de las cepas, clasificadas como altamente tóxicas.

Para tener un comparativo sobre la actividad fungicida de las nanopartículas bimetálicas, se utilizaron nanopartículas de plata y nanopartículas de cobre como testigos. Es importante aclarar que las nanopartículas de cobre fueron sintetizadas utilizando hidracina como agente reductor y goma arábica como agente estabilizante, debido a que el extracto acuoso de las hojas de *P.koidzumii* no tuvo la capacidad para reducir los iones metálicos de cobre. La MIC de las nanopartículas de cobre fue de 191 µg/mL y de 49 µg/mL, para el hongo *A. flavus* y el hongo *F. verticillioides*, respectivamente. Por otro lado, las nanopartículas de plata presentaron una MIC de 108 µg/mL para el *A. flavus* y de 42 µg/mL para el *F. verticillioides*. Las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides* a una concentración de 85 µg/mL y 42 µg/mL, respectivamente. Al analizar los datos puede observarse que la susceptibilidad del hongo *F. verticillioides* fue mayor para los tres tipos de nanopartículas en comparación con el *A. flavus* (Tabla 1).

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas.

Tratamiento	Concentración Inicial	MIC para <i>A. Flavus</i>	MIC para <i>F. verticillioides</i>
Anfotericina B	200 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL
Cobre reducción química	396 µg/mL	191 µg/mL	49 µg/mL
Bimetálicas de Cu/Ag sintetizadas con <i>P. koidzumii</i>	85 µg/mL	85 µg/mL	42 µg/mL
Plata sintetizadas con <i>P. koidzumii</i>	108 µg/mL	108 µg/mL	26 µg/mL

Las nanopartículas de cobre y las nanopartículas de plata presentan una inhibición del crecimiento del hongo *A. flavus* a concentraciones mayores, en comparación con las nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag, indicando un ligero efecto sinérgico entre ambos metales. Asghar *et al.*, (2018) reportaron el efecto inhibitorio de nanopartículas de cobre y nanopartículas de plata sintetizadas utilizando extracto acuoso de hojas de té (verde y negro) sobre el crecimiento del hongo *A. flavus* y la

producción de aflatoxinas. Los autores indican que las nanopartículas de plata presentaron mayor actividad antifúngica y que a 100 µg/mL, estas nanopartículas inhibieron por completo la síntesis de aflatoxinas, mientras que las de cobre inhibieron solo el 77%.

Para confirmar la MIC de los tratamientos, estos fueron sembrados en medio sólido (sembrado en placa). En la concentración de 85 µg/mL de las nanopartículas bimetalicas Cu/Ag no se observó crecimiento del hongo *A. flavus* (Figura 11). Para el caso del hongo *F. verticillioides* (Figura 12), la MIC de las nanopartículas bimetalicas de Cu/Ag fue confirmada, ya que a la concentración de 42 µg/mL no se observó crecimiento. Estos resultados confirman que las nanopartículas bimetalicas de Cu/Ag sintetizadas con el extracto de *P. koidzumii* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo, haciéndolas una alternativa de bajo costo y con un impacto ambiental mucho menor a los compuestos fungicidas comerciales. Hasta nuestro conocimiento, en la literatura no hay estudios realizados para evaluar la actividad fungicida de las nanopartículas bimetalicas contra hongos patógenos de interés no solo en sector agrícola, sino también en el área médica veterinaria y humana como lo es el hongo *A. flavus*. Sin embargo, varios estudios se han llevado a cabo para evaluar la actividad antifúngica de las nanopartículas de cobre, por mencionar: Ramyadevi *et al.*, (2012) evaluaron su actividad contra *A. flavus*, *A. niger*, and *C. albicans*, encontrando que la máxima actividad de las partículas se presentó contra *C. albicans*, mientras que la mínima actividad fue para *A. flavus*. Además, estos autores también reportaron que las nanopartículas de cobre tuvieron mayor actividad contra bacterias en comparación con los hongos.

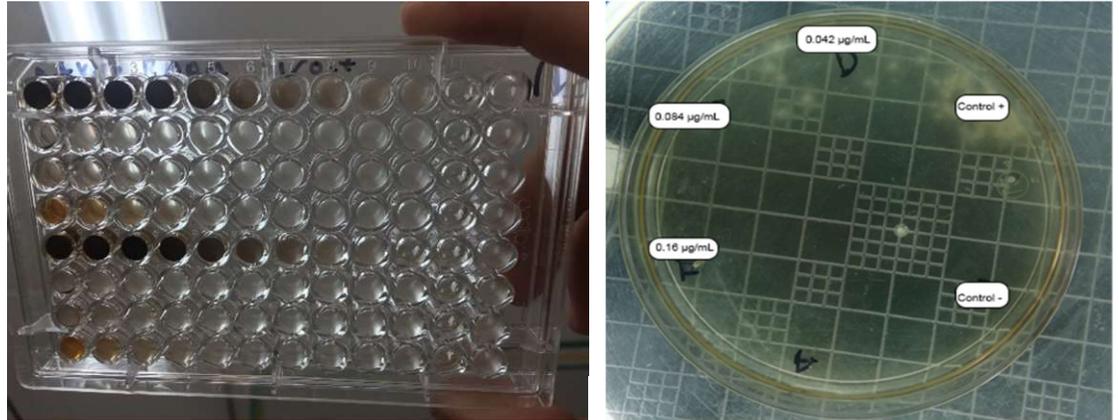


Figura 23. Fotografía de la placa para determinar la MIC y la prueba confirmatoria en agar de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con *P. koidzumii* contra *A. flavus*



Figura 24. Fotografía de la placa para determinar la MIC y la prueba confirmatoria en agar de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas con *P. koidzumii* contra *F. verticillioides*

Diversos autores han expuesto los posibles mecanismos de acción de las nanopartículas en la inhibición del crecimiento de los hongos filamentosos. León *et al* (2017) realizaron un estudio de actividad antimicrobiana dentro del ámbito intra hospitalario, los autores proponen que el mecanismo de las nanopartículas de CuO se debe a la interacción directa con la membrana de los microorganismos, en ese contexto sugieren que el utilizar óxidos metálicos genera especies reactivas de

oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y estas especies podrían originar un mal funcionamiento de los componentes de la célula tales como el ADN, lípidos, y proteínas.

## **6. Conclusiones**

En este trabajo de investigación se establecieron las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas bimetálicas de Cu/Ag utilizando el extracto acuoso de las hojas de la *P. koidzumii*, con un tamaño promedio de 40 nm determinado por TEM, y de naturaleza Core/Shell.

Las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag presentaron mayor actividad fungicida que las nanopartículas de plata y las nanopartículas de cobre, utilizadas como testigos.

La efectividad fungicida de las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag fue mayor para el hongo *F. verticillioides*.

Finalmente, se puede concluir que las nanopartículas bimetálicas Cu/Ag sintetizadas vía química verde con *P. koidzumii* pueden considerarse como una opción sostenible para el control del crecimiento de hongos de interés en la salud y la producción animal.

## **7. Recomendaciones**

Se recomienda realizar pruebas de estas nanopartículas a las concentraciones sintetizadas en cultivos celulares para determinar la toxicidad de las nanopartículas bimetálicas, recordando que la intención es desarrollar un producto que se pueda aplicar comercialmente al grano de maíz destinado para la salud animal, por lo tanto es de vital importancia determinar el beneficio o daño que podría causar las nanopartículas en las células del sistema digestivo, o en otros sistemas celulares.

De igual forma se recomienda buscar realizar trabajo colaborativo y cooperativo para diseñar un mecanismo de aplicación eficiente y efectivo para que el producto pueda ser utilizado en maíz almacenado o en el campo.

## 8. Referencias

- AbdelHamid, A. A., M. A. Al-Ghobashy, M. Fawzy, M. B. Mohamed & M. M. S. A. Abdel-Mottaleb (2013). "Phytosynthesis of Au, Ag, and Au–Ag Bimetallic Nanoparticles Using Aqueous Extract of Sago Pondweed (*Potamogeton pectinatus* L.)." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 1(12): 1520-1529.
- Ahamed, M., H. A. Alhadlaq, M. Khan, P. Karuppiah & N. A. Al-Dhabi (2014). "Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles." *Journal of Nanomaterials* 2014: 17.
- Anastas, P. & N. J. C. S. R. Eghbali (2010). "Green chemistry: principles and practice." *Chemical Society Reviews* 39(1): 301-312.
- Anastas, P. T., M. M. Kirchhoff & T. C. Williamson (2001). "Catalysis as a foundational pillar of green chemistry." *Applied Catalysis A: General* 221(1): 3-13. Autor, A. A., y Autor, B. B. (Año). Título del Libro. Lugar: Editorial.
- Arenas, G. R. (2013). *Micología médica ilustrada*. 4ª Edición. Mexico: McGraw Hill
- Arfat, Y. A., J. Ahmed & H. J. C. p. Jacob (2017). "Preparation and characterization of agar-based nanocomposite films reinforced with bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles." *Carbohydrate polymers* 155: 382-390.
- ASERCA (2016). "Producción y consumo año comercial 2015/16 (maíz, trigo, sorgo, soya, frijol, arroz, cebada, canola y otros)." Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios.
- Asghar, M. A., E. Zahir, S. M. Shahid, M. N. Khan, M. A. Asghar, J. Iqbal & G. J. L. Walker (2018). "Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using

green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B1 adsorption activity." LWT 90: 98-107.

Belmares-Perales, S., E. Torres-López, J. Coparán-Elizondo, J. Arriaga-Garza & N. Elizondo-Villarreal (2013). "Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y hierro por el método de fisicoquímica verde." 3er Foro de Divulgación Científica y Tecnológica 1-5.

Brumbaugh, A. D., K. A. Cohen & S. K. St. Angelo (2014). "Ultrasmall copper nanoparticles synthesized with a plant tea reducing agent." ACS Sustainable Chemistry & Engineering 2(8): 1933-1939.

Chitose, N., S. Ueta, S. Seino & T. A. J. C. Yamamoto (2003). "Radiolysis of aqueous phenol solutions with nanoparticles. 1. Phenol degradation and TOC removal in solutions containing TiO<sub>2</sub> induced by UV,  $\gamma$ -ray and electron beams." Chemosphere, 50(8): 1007-1013.

CLSI, C. (2016). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical Lab Standards Institute.

Davis, N. D., U. Diener & D. J. A. E. M. Eldridge (1966). "Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium." Applied and Environmental Microbiology 14(3): 378-380.

Di Domenico, A. S., D. Christ, E. H. Hashimoto, C. Busso & S. R. M. J (2015). "Evaluation of quality attributes and the incidence of *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. in different types of maize storage." Journal of Stored Products Research 61: 59-64.

Dobrovolný, K., P. Ulbrich, M. Švecová, S. Rimpelová, J. Malinčík, M. Kohout, J. Svoboda, V. (2017). "Copper nanoparticles in glycerol-polyvinyl alcohol matrix: *In situ* preparation, stabilisation and antimicrobial activity." Journal of Alloys and Compounds 697: 147-155.

- Dong, X., X. Ji, H. Wu, L. Zhao, J. Li & W. Yang (2009). "Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction." *The Journal of Physical Chemistry C* 113(16): 6573-6576.
- Dubey, S. P., M. Lahtinen, M. J. C. Sillanpää, (2010). "Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 364(1-3): 34-41.
- Echevarría-Castillo, F. J. R. C. d. H., (2013). "Retos de este siglo: nanotecnología y salud." *Inmunología y Hemoterapia* 29(1): 3-15.
- Ezzeddine, B. (1999). Tercera conferencia mixta internacional sobre micotoxinas, Túnez. FAO/OMS/PNUMA.
- Freitas Jr, R. A. J. N. N., (2005). "What is nanomedicine?" *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 1(1): 2-9.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). *Global food losses and food waste* (pp. 1-38). Rome: FAO.
- Goyal, G., J. Hwang, J. Aviral, Y. Seo, Y. Jo, J. Son, J. J. (2017). "Green synthesis of silver nanoparticles using  $\beta$ -glucan, and their incorporation into doxorubicin-loaded water-in-oil nanoemulsions for antitumor and antibacterial applications." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 47: 179-186.
- Gyawali, R., S. A. Ibrahim, S. H. Abu Hasfa, S. Q. Smqadri & Y. Haik (2011). "Antimicrobial activity of copper alone and in combination with lactic acid against *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and on the surface of lettuce and tomatoes." *Journal of pathogens* .2011:
- Huwig, A., S. Freimund, O. Käppeli & H. (2001). "Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents." *Toxicology Letters* 122(2): 179-188.

- IARC, W. G. o. t. E. o. C. R. t. H., International Agency for Research on Cancer (1993). "Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins."
- Jain, K. K. J. (2008). "Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice." *Medical Principles and Practice*, 17(2): 89-101.
- Jardon-Xicotencatl, S., R. Díaz-Torres, A. Marroquín-Cardona, T. Villarreal-Barajas & A. J. T. Méndez-Albores (2015). "Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water." *Toxins* 7(10): 4294-4314.
- Jouany, J. P. (2007). "Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds." *Animal Feed Science and Technology* 137(3-4): 342-362.
- Kasthuri, J., S. Veerapandian & N. Rajendiran (2009). "Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68(1): 55-60.
- Keller, L., M. G. Pereyra, K. Keller, V. Alonso, A. Oliveira, T. Almeida, T. Barbosa, L. Nunes, L. Cavaglieri (2013). "Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation." *Journal of Stored Products Research* 52: 42-47.
- Kim, N. R., K. Shin, I. Jung, M. Shim & H. M. Lee (2014). "Ag–Cu bimetallic nanoparticles with enhanced resistance to oxidation: a combined experimental and theoretical study." *The Journal of Physical Chemistry C* 118(45): 26324-26331.
- Lee, H. J., Lee, G., Jang, N. R., Yun, J. H., Song, J. Y., & Kim, B. S. (2011). Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract. *Nanotechnology, NSTI-Nanotech* 1(1), 371-374.
- Leite, D. C., Peres, G. L., & Silveira, N. P. D. (2013). Caracterização de complexos metálicos de amilopectina modificada por UV-VIS e FT-IR. In Congresso

- Brasileiro de Polímeros (12.: 2013 set. 22-26: Florianópolis, SC).[Anais][recurso eletrônico]. Florianópolis, SC: Associação Brasileira de Polímeros, 2013..
- León, M. M. G., Mendoza, L. E. R., Basurto, F. V. C., Torres, D. J. M., Condori, C., Vivas, D., ... & Veliz, J. L. S. (2017). Nanopartículas de CuO y su propiedad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias. *Revista Colombiana de Química*, 46(3), 28-36.
- Mafuné, F., J.-y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow & Sawabe (2000). "Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution." *The Journal of Physical Chemistry B* 104(39): 9111-9117.
- Manikandan, V., P. Velmurugan, J.-H. Park, N. Lovanh, S.-K. Seo, P. Jayanthi, Y.-J. Park, M. Cho & B.-T. J. Oh (2016). "Synthesis and antimicrobial activity of palladium nanoparticles from *Prunus x yedoensis* leaf extract." *Materials Letters* 185: 335-338.
- Marková, Z., K. n. M. Šišková, J. Filip, J. Čuda, M. Kolář, K. r. Šafářová, I. Medřík & R. Zbořil (2013). "Air stable magnetic bimetallic Fe–Ag nanoparticles for advanced antimicrobial treatment and phosphorus removal." *Environmental science & technology* 47(10): 5285-5293.
- Medina-Ramirez, I., S. Bashir, Z. Luo & J. L. Liu (2009). "Green synthesis and characterization of polymer-stabilized silver nanoparticles." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73(2): 185-191.
- Méndez-Albores, J., G. Arámbula-Villa, M. Loarca-Piña, J. González-Hernández, E. Castaño-Tostado & Moreno-Martinez (2004). "Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes." *Journal of Stored Products Research* 40(1): 87-94.
- Moreno-Limón, S., S. Salcedo-Martínez, M. Cárdenas-Ávila, J. Hernández-Piñero & M. J. P. Núñez-González (2012). "Efecto antifúngico de capsaicina y

- extractos de chile piquín (*Capsicum annum* l. var *aviculare*) sobre el crecimiento in vitro de *Aspergillus flavus*." 34(1): Polibotánica. 191-204.
- Mortier, T., A. Persoons & Verbiest (2006). "Two-step synthesis of high aspect ratio gold nanorods." *The Journal of Open Chemistry*, 4(1): 160-165.
- Munkvold, G. P., R. L. Hellmich & Rice (1999). "Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids." *Plant disease* 83(2): 130-138.
- Muzikansky, A., P. Nanikashvili, J. Grinblat & Zitoun (2013). "Ag dewetting in Cu@Ag monodisperse core-shell nanoparticles." *The Journal of Physical Chemistry C* 117(6): 3093-3100.
- Neira García, I. (2015). Síntesis verde de nanopartículas para la eliminación de colorantes en medios acuosos. Universidad da coruña. (1):1-80.
- Padrón, M., H. Yuef, S. Hernández Delgado, C. A. Reyes Méndez & G. J. Vázquez Carrillo (2013). "El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: Problemática y Perspectivas." *Revista mexicana de fitopatología* 31(2): 126-146.
- Panigrahi, S., S. Kundu, S. Ghosh, S. Nath & T. J.. Pal (2004). "General method of synthesis for metal nanoparticles." *Journal of Nanoparticle Research* 6(4): 411-414.
- Parra, F. F., G. Z. Corvera, S. J. Ambriz & E. G. Rodríguez (2004). "Dosis Óptima para *Prostephanus truncatus*, Residualidad y Fitotoxicidad de Clorpirifos metil y Deltametrina en Maíz Almacenado." *Revista Agraria-Nueva Epoca-Año XVII*·52(1).
- Peng, S., C. Wang, J. Xie & S. Sun (2006). "Synthesis and stabilization of monodisperse Fe nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society*, 128(33): 10676-10677.

- Philip, D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 42(5), 1417-1424.
- Puente-Urbina, B., L. García-Cerda, E. de León-Quiroz & M. López-Martínez (2012). "Nanopartículas de Ni/NiO y Cu-Ag obtenidas mediante el método de Pechini: síntesis y caracterización." *Superficies y vacío*, 25(3): 183-187.
- Quezada, M. Y., J. Moreno, M. E. Vázquez, M. Mendoza, A. Méndez-Albores, E. Moreno-Martínez & Technology (2006). "Hermetic storage system preventing the proliferation of *Prostephanus truncatus* Horn and storage fungi in maize with different moisture contents." *Postharvest Biology and Technology* 39(3): 321-326.
- Raffi, M., S. Mehrwan, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed, W. Yawar & M. M. ul Hasan (2010). "Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*." *Annals of microbiology* 60(1): 75-80.
- Rai, M., A. Yadav & A. Gade (2009). "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials." *Biotechnology advances* 27(1): 76-83.
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
- Ramyadevi, J., K. Jeyasubramanian, A. Marikani, G. Rajakumar & A. A. Rahuman (2012). "Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles." *Materials Letters* 71: 114-116.
- Rushing, B. R., M. I. J. F. Selim & c. toxicology (2018). "Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods." *Food and chemical toxicology*. 124:2019 :81-100
- SADER-SIAP (2019). Expectativas Agroalimentarias 2019. SADER-SIAP, MEX, SADAR-SIAP.

- SAGARPA-SIAP (2018). Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. SAGARPA-SIAP, MEX, SAGARPA-SIAP.
- Sathishkumar, M., K. Sneha, S. W. Won, C. W. Cho, S. Kim & Y. S. Yun (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(2): 332-338.
- Serrano-Coll, H. A. & N. Cardona-Castro (2015). "Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos." 29(1): *CES Medicina* 143-151.
- Shalaka, A. M., R. C. Pratik, B. S. Vrishali & P. K. Suresh (2011). "Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Cymbopogon Citratus (Lemongrass) and its Antimicrobial Activity." *Nano-Micro Letters* 3(3): 189-194.
- Sharma, V. K., R. A. Yngard & Y. Lin (2009). "Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities." *Advances in colloid and interface science* 145(1): 83-96.
- Sheny, D. S., J. Mathew & D. Philip (2011). "Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*." *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 79(1): 254-262.
- Silva, G. A. (2004). "Introduction to nanotechnology and its applications to medicine." *Surgical neurology* 61(3): 216-220.
- Silvestri, S. O., A. C. Munuce, M. E. Alassia, A. Seferian, A. Reviglio & L. R. Soria (2014). *Nanotecnología hoy : el desafío de conocer y enseñar*, Ministerio de Educación de la Nación.
- Sinha, K., J. Ghosh & P. C. Sil (2017). *New pesticides: A cutting-edge view of contributions from nanotechnology for the development of sustainable agricultural pest control. New Pesticides and Soil Sensors*, Elsevier: 47-79.

- Subhankari, I. & P. Nayak (2013). "Synthesis of Copper Nanoparticles Using *Syzygium aromaticum* (Cloves) Aqueous Extract by Using Green Chemistry." *World* 2(1): 14-17.
- Tan, K. S. & K. Y. Cheong (2013). "Advances of Ag, Cu, and Ag–Cu alloy nanoparticles synthesized via chemical reduction route." *Journal of nanoparticle research* 15(4): 1-29.
- Tefera, T. (2012). "Post-harvest losses in African maize in the face of increasing food shortage." *Food security* 4(2): 267-277.
- Toshima, N. & T. Yonezawa (1998). "Bimetallic nanoparticles-novel materials for chemical and physical applications." *New Journal of Chemistry* 22(11): 1179-1201.
- Tsuji, M., S. Hikino, R. Tanabe, M. Matsunaga & Y Sano (2010). "Syntheses of Ag/Cu alloy and Ag/Cu alloy core Cu shell nanoparticles using a polyol method." *CrystEngComm* 12(11): 3900-3908.
- Uribe, G. M. & J. L. Rodríguez-López (2007). "La nanociencia y la nanotecnología: Una revolución en curso." *Perfiles latinoamericanos: revista de la Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Sede México*(29): 161-186.
- Usman, M. S., M. E. E. Zowalaty, K. Shamel, N. Zainuddin, M. Salama & N. A. Ibrahim (2013). "Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine* 8: 4467-4479.
- Valodkar, M., S. Modi, A. Pal & S. Thakore (2011). "Synthesis and anti-bacterial activity of Cu, Ag and Cu–Ag alloy nanoparticles: a green approach." *Materials Research Bulletin* 46(3): 384-389.
- Wicklow, D. T., S. Roth, S. T. Deyrup & J. B. Gloer (2005). "A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*" *Dedicated to John Webster on the occasion of his 80th birthday.* *Mycological research* 109(5): 610-618.

- Williams, W. P. & G. L. Windham (2009). "Diallel analysis of fumonisin accumulation in maize." *Field crops research* 114(2): 324-326.
- Yan, N., C. Xiao & R. Kou (2010). "Transition metal nanoparticle catalysis in green solvents." *Coordination Chemistry Reviews* 254(9-10): 1179-1218.
- Zain, N. M., A. Stapley & G. Shama (2014). "Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications." *Carbohydrate polymers* 112: 195-202.
- Zavala-Franco, A., Hernández-Patlán, D., Solís-Cruz, B., López-Arellano, R., Tellez-Isaias, G., Vázquez-Durán, A., & Méndez-Albores, A. (2018). Assessing the Aflatoxin B1 Adsorption Capacity between Biosorbents Using an In Vitro Multicompartmental Model Simulating the Dynamic Conditions in the Gastrointestinal Tract of Poultry. *Toxins*, 10(11), 484.
- Zhao, J., D. Zhang & J. Zhao (2011). "Fabrication of Cu–Ag core–shell bimetallic superfine powders by eco-friendly reagents and structures characterization." *Journal of Solid State Chemistry* 184(9): 2339-2344.