

Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos

Nicolaza Pariona¹, L. A. Hermida-Montero¹, Arturo I. Mtz-Enriquez², D. Sánchez-Rangel^{1,3}, Gloria Carrión¹, Daniel Lopez-Lima¹, Greta Rosas-Saito¹, Benjamin Rodriguez-Hass¹ y Zelene Duran-Barradas¹.

¹ Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A.C., Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, 91070 Xalapa, Veracruz, México.

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Saltillo, Av. Industria Metalúrgica 1062, Parque Industrial Ramos Arizpe, 25900 Coahuila, México

³ Cátedra CONACYT en el Instituto de Ecología A.C., 91070 Xalapa, Veracruz, México.

Recibido 11 de noviembre del 2018, Revisado el 12 de diciembre de 2018.

Aceptado el 14 de diciembre de 2018

DOI: <https://doi.org/10.33017/RevECIPeru2018.0017/>

Resumen

Los hongos fitopatógenos son uno de los mayores problemas que afecta al sector agrícola, causando pérdidas que sobrepasan miles de millones de dólares al año. Aunado a esto, la resistencia antifúngica dificulta el control de los hongos fitopatógenos y es necesario encontrar alternativas de control de bajo costo y no contaminen el ambiente. Por lo anterior, el objetivo principal de este proyecto fue sintetizar nanopartículas de cobre (NPs-Cu) y evaluar su actividad antifúngica contra diferentes hongos fitopatógenos. Las NPs-Cu se sintetizaron por el método de reducción y se caracterizaron mediante la técnica de Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). La evaluación de actividad antifúngica de las NPs-Cu se realizaron contra cinco especies de hongos fitopatógenos (*Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Verticillium dahlie*, *Neofusicoccum sp.* y *Fusarium oxysporum*). Los resultados demostraron que el efecto antifúngico de las NPs-Cu depende de la concentración utilizada y especie de hongo. Por lo tanto, las NPs-Cu obtenidas tienen potencial aplicación en el control de agentes fitopatógenos.

Descriptor: *Nanopartículas, antifúngicos, Fusarium.*

Abstract

Phytopathogenic fungi are one of the biggest problems affecting the agricultural sector, causing losses that exceed billions of dollars per year. In addition to this, antifungal resistance hinders the control of phytopathogenic fungi and it is necessary to find control alternatives of low cost that do not contaminate the environment. Therefore, the main objective of this project was to synthesize copper nanoparticles (NPs-Cu) and evaluate their antifungal activity against different phytopathogenic fungi. NPs-Cu were synthesized by the reduction method and characterized by X-Ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The antifungal activity evaluation of the NPs-Cu was carried out against five species of phytopathogenic fungi (*Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Verticillium dahlie*, *Neofusicoccum sp.*, and *Fusarium oxysporum*). The results showed that the antifungal effect of NPs-Cu depends on the concentration used and species of fungus. Therefore, the NPs-Cu obtained have potential application to control phytopathogenic agents.

Keywords: *Nanoparticles, antifungal, Fusarium.*

1. Introducción

La nanotecnología estudia el diseño, caracterización, producción y aplicaciones de

estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y tamaño a escala nanométrica. Entre los nanomateriales, las nanopartículas metálicas debido a sus propiedades físico-químicas

únicas han llamado la atención en diferentes campos, tales como la medicina (marcadores celulares, acarreadores de fármacos), industria energética (mejoramiento de las celdas fotovoltaicas), electrónicos (detectores) y agrícola [1]. En los últimos años, la síntesis y la utilización de nanopartículas (NPs) metálicas han demostrado ser excelentes agentes antimicrobianos de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus, ello debido a su gran relación superficie a volumen y estructura cristalina, provocan respuestas biológicas diferentes de las producidas por la forma iónica tradicional de los metales. Además, se reporta que las NPs metálicas tienen efecto 7-50 veces menos tóxico para las células de mamífero que sus correspondientes formas iónicas y efecto prolongado como fuente de elementos en un organismo [2]. En los últimos años, la agricultura es uno de los campos donde las nanopartículas metálicas tienen posibilidades de aplicación como fertilizantes, herbicidas, fotocatalizadores para la degradación de pesticidas y fungicidas/bactericidas [3]. Se ha reportado que entre las nanopartículas metálicas, las nanopartículas de plata, cobre, zinc, magnesio y titanio tienen propiedades antimicrobianas, lo cual se debe posiblemente a la gran superficie de contacto de la nanopartículas y a los iones metálicos que liberan y generan especies reactivas de oxígeno [3,4]. Así mismo, de acuerdo a la literatura, las nanopartículas de zinc, magnesio y hierro tienen efectos positivos en el crecimiento de las plantas, ello debido a que son parte de los nutrientes esenciales para la planta [3,5]. Las nanopartículas de cobre son de gran interés debido a sus propiedades antimicrobianas [6], además de ser más económicos en comparación con otros metales con propiedades antimicrobianas similares [7]. En literatura se ha reportado ampliamente el efecto bactericida de las nanopartículas de cobre contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* [8]. Sin embargo, son pocos los estudios de la actividad antifúngica de las nanopartículas de cobre. Por ejemplo: Kanhed *et al.* demostraron la actividad antifúngica de las nanopartículas de cobre contra algunos hongos fitopatógenos *Phoma destructiva*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, [6]. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue sintetizar nanopartículas de cobre con propiedades antifúngicas para el control de hongos fitopatógenos.

2. Metodología

2.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (NPs-Cu)

La síntesis de las nanopartículas se realizó por el método de reducción. Para ello, se disolvió 0.1M de citrato de sodio en 100 ml de agua MiliQ, luego se agregó 0.2 M de sulfato de cobre y se dejó en agitación por 20 min. Luego se adicionó 0.2 M de ácido ascórbico diluido en 50 ml de agua MiliQ, luego 30 ml de hidróxido de sodio 1M fue añadido y se dejó en agitación a 90 °C por 1h.

La caracterización de tamaño y morfología de las NPs-Cu se realizó mediante la técnica de microscopía electrónico de barrido (MEB) JEOL modelo JSM5800LV. Para la preparación de las muestras, las NPs se pulverizaron en mortero de Ágata. Seguido, estas fueron dispersadas sobre un soporte de carbón especial para la observación al microscopio. Las fases cristalinas de las NPs-Cu se determinaron por el método de difracción de rayos X (DRX). Para ello, se utilizó un difractómetro PANalytical X'Pert PRO MPD, el cual posee un detector PW3011/20 X'celerator y una fuente de radiación λ (CuK α) de 1.54 Å. El rango de medida fue de 30 a 90° (2 θ).

2.2 Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de las NPs-Cu

La evaluación de la actividad antifúngica de las NPs-Cu se realizaron contra 5 cepas de hongos fitopatógenos tales como: *Fusarium solani*, es un hongo que afecta especies de importancia forestal y agrícola, *Fusarium verticillioides*, el cual es altamente patogénico (productor de FB1; micotoxinas que pueden afectar a humanos y animales) y afecta a cultivos de importancia agrícola [9]. *Verticillium dahliae*, es un hongo de suelo patogénico que afecta a cultivos agrícolas [10]. *Neofusicoccum* sp (hongo del género *Botryosphaerie*), hongo que por lo general afecta a especies arbóreas de importancia forestal [11] y *Fusarium oxysporum*, el cual es un hongo que afecta a cultivos agrícolas [12] y esta cepa en particular fue caracterizado e identificado con un gen patogénico para el tomate.

Para la evaluación *in vitro*, se utilizaron cajas Petri de 60 mm de diámetro conteniendo medio agar papa dextrosa (APD) suplementadas con diferentes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL) de NPs-Cu, en el cual una suspensión de esporas (10⁶ ufc/mL) de cada cepa de hongo fitopatógeno fue inoculada en el centro de cada caja Petri. Para el control de cada cepa solo se adicionó agua estéril. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y se incubaron a 29 °C durante 6 días. El registro fotográfico y la medición del radio o diámetro de

crecimiento del micelio se realizaron a los 6 días. Así mismo, el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{PIC (\%)} = 100 \left[\frac{d_c - d_t}{d_c} \right] \quad (1)$$

Donde d_c (mm) es el diámetro promedio de la colonia en el control y d_t (mm) es el diámetro promedio de la colonia de cada tratamiento.

2.3 Evaluación *in vivo* de la actividad antifúngica de las NPs-Cu

La evaluación *in vivo* de la actividad antifúngica de las NPs-Cu se determinó en un hongo con un gen patógeno específico a su hospedero y que además la planta a probar sería de rápido crecimiento. Por lo anterior, se seleccionó como modelo de estudio a *Fusarium oxysporum* caracterizado e identificado con un gen de patogenicidad para el tomate. La evaluación se realizó en forma preventiva y curativa. Para ello, con una suspensión de 10^6 esporas/mL de *Fusarium oxysporum* se inocularon charolas de siembra de 70 cavidades, las cuales contenían mezcla de suelo, arena, vermiculita y Peat Moss (20:15:15:50) esterilizada y se incubaron durante 7 días a 28 °C en la oscuridad. Para la prueba de efectos preventivos, se prepararon suspensión de NPs-Cu en agua en concentraciones de 0.5 (DB), 0.75 (DM) y 1 mg/mL (DA) y se añadió sobre el sustrato inoculado, posteriormente se sembraron las semillas de tomate. Para la prueba de efectos curativos, se sembraron las semillas de tomate en las charolas inoculadas con el patógeno, y la aplicación de las diferentes concentraciones de NPs-Cu se realizó una vez que se haya evidenciado infección por el hongo. Los tratamientos controles fueron: control absoluto (CA) (sin inóculo del hongo patógeno) y control positivo (CI) (con inóculo del hongo patógeno, pero sin tratamiento de nanopartículas) y un control comercial (CC) (fungicida comercial de uso regional, Cupravit), dentro de cada grupo de prueba se inocularon de manera similar con agua destilada estéril. Las charolas se incubaron en un invernadero con fotoperiodo de 16 h durante 4 semanas. El riego fue de manera regular para mantener el contenido de humedad del suelo a una capacidad de retención de agua del 75 %. Se registraron los porcentajes de germinación. El experimento se realizó dos veces, cada tratamiento con tres réplicas y cada réplica con 50 semillas. La evaluación del porcentaje del efecto

preventivo y curativo se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto (\%)} = 100 \left[\frac{I_c - I_t}{I_c} \right] \quad (2)$$

Donde I_c =incidencia de la enfermedad del control, I_t = incidencia de la enfermedad del tratamiento.

3. Resultados y discusión

3.1 Síntesis y caracterización de las NPs-Cu

La síntesis de las NPs-Cu se realizó mediante el método de reducción química en solución acuosa.

El patrón de DRX registrado para las NPs-Cu se muestra en la fig. 1. Los picos de DRX se indizaron utilizando archivos JCPDS (número de tarjeta: 89-2838). Las posiciones de los picos XRD fueron consistentes con el cobre metálico. Los picos delgados del patrón XRD indican la naturaleza cristalina. Así mismo, los picos a 43.3165°, 50.4478° y 74.1237° corresponden a los planos (111), (200) y (220) respectivamente, correspondientes a una estructura cúbica centrada en las caras. Estos resultados son consistentes con los previamente reportados [13,14].

La morfología de las NPs-Cu se estudió mediante la técnica de MEB. En la Fig. 2 se puede observar que las NPs-Cu son facetadas en forma de hexágonos regulares con tamaños que van desde 150 a 320 nm.

3.2 Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de las NPs-Cu

Como se puede ver en los resultados (Fig.3 y 4), NPs-Cu tiene un efecto antifúngico sobre todas las cepas de hongo fitopatógeno en la que se evaluó. Se puede observar que el porcentaje de inhibición incrementa conforme se incrementa la concentración de NPs-Cu para todas las cepas (Fig. 4). Sin embargo, también se puede ver que el efecto de cada concentración puede variar de cepa a cepa (Fig. 3 y 4).

Se puede observar que para la cepa *F. solani* desde la concentración más baja (0.1mg/mL) de NPs-Cu, esta ha inhibido el 58 % de crecimiento (Fig. 4), así mismo se nota un cambio de la morfología de la colonia comparada con el control (Fig. 3). Por otro lado, para las cepas *F. verticillioides*, y *V. dahlie*, si bien se puede observar que a concentraciones bajas (0.1 y 0.25 mg/mL) no hay una gran inhibición,

pero a concentraciones de 0.75 y 1mg/mL el porcentaje de inhibición es de 74 y 78 % respectivamente (Fig. 4) y la morfología cambia drásticamente conforme incrementa la concentración (Fig. 3). Las cepas más sensibles a NPs-Cu resultaron ser *Neofusicoccum sp* y *F. oxysporum*., como se puede observar desde una

concentración de 0.5 mg/mL logran inhibir el 95 y 98 % respectivamente (Fig. 4). Los resultados nos indican que el efecto antifúngico dependerá de la especie de hongo, es decir posee especificidad [8]. Así mismo, dependerá la concentración de nanopartículas.

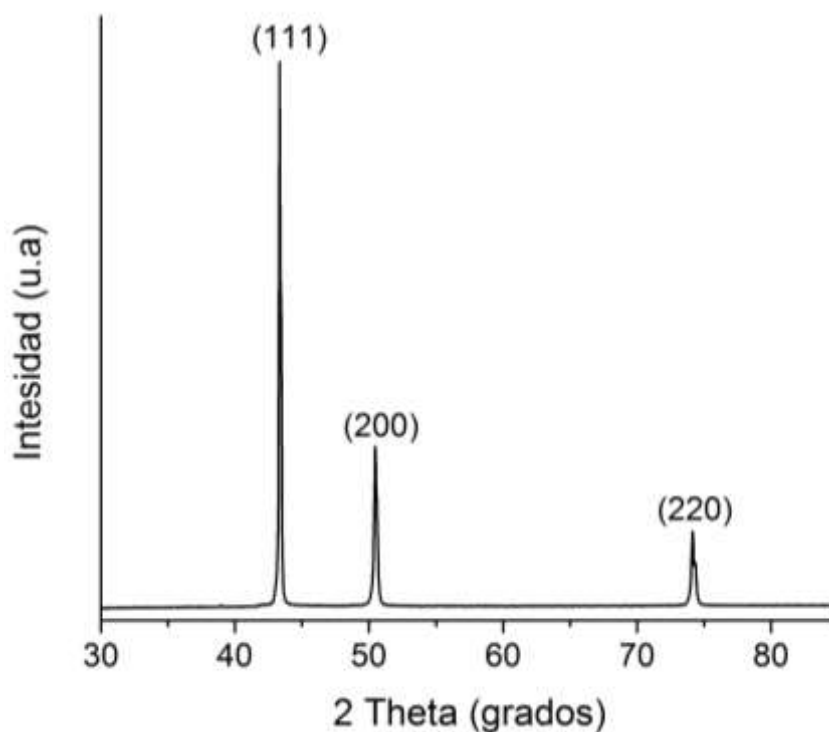


Figura 1: Patrón de DRX de las NPs-Cu.

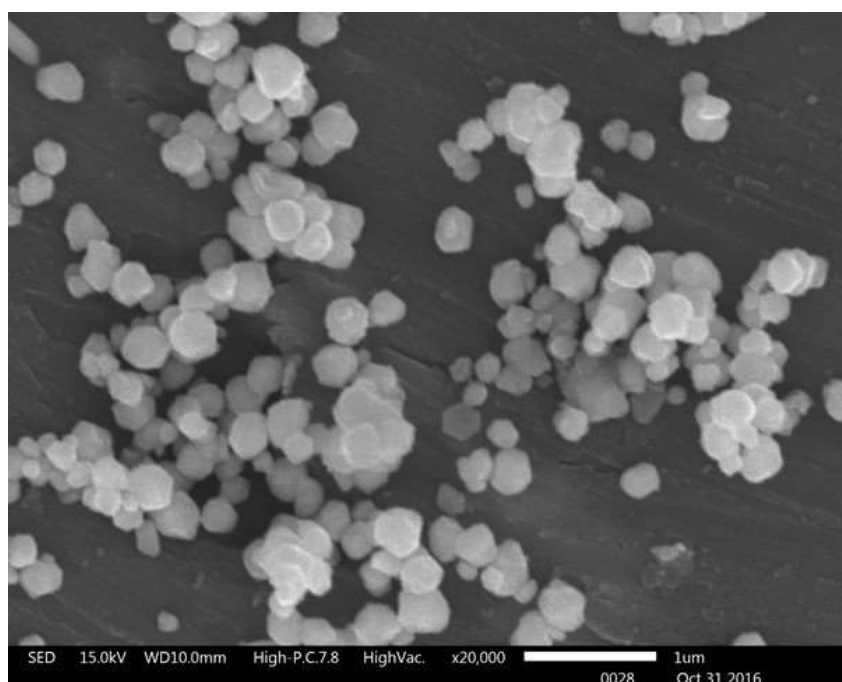


Figura 2: Imagen MEB de las NPs-Cu.

De acuerdo a la literatura, la actividad antifúngica de las NPs-Cu sobre los hongos se debe principalmente a las especies de oxígeno reactivo (ROS) generados por la superficie de las nanopartículas y los iones Cu^{+2} [15]. Las ROS producidos causan la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y degradación del ADN [16]. Sin embargo, como se pueden observar en los resultados que el efecto antifúngico dependerá de la especie de hongo, es decir posee especificidad [8] y de la concentración de las NPs-Cu (Fig.3 y 4).

3.3 Evaluación in vivo de la actividad antifúngica de las NPs-Cu

El estudio de actividad antifúngica de las NPs-Cu a nivel invernadero se llevó a cabo desde la evaluación en la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas de tomate. La fig. 5 muestra los porcentajes de germinación de las semillas con los diferentes tratamientos, como se

puede observar todos los tratamientos superan el 80% de germinación de las semillas, tanto en el actividades preventivas y curativas, lo que significa que a nivel de germinación el hongo patógeno *F. oxysporum* no afecta. Así mismo, indica que no hay un efecto fitotóxico con los respectivos tratamientos.

En la fig. 6 se muestra el porcentaje de incidencia de la enfermedad ocasionado por el hongo *F. oxysporum*, en el cual se puede observar que en los tratamientos con las NPs-Cu, tanto preventivo como curativo hay un bajo porcentaje de incidencia comparado con el tratamiento comercial. En tratamiento preventivo, se puede observar que conforme incrementa la dosis de NPs-Cu, baja el porcentaje incidencia. Sin embargo, en el tratamiento curativo, casi no importa la dosis de aplicación de la NPs-Cu, no hay diferencias significativas entre las dosis aplicadas. Con esto podemos decir que la aplicación de estas nanopartículas sería mejor de manera preventiva.

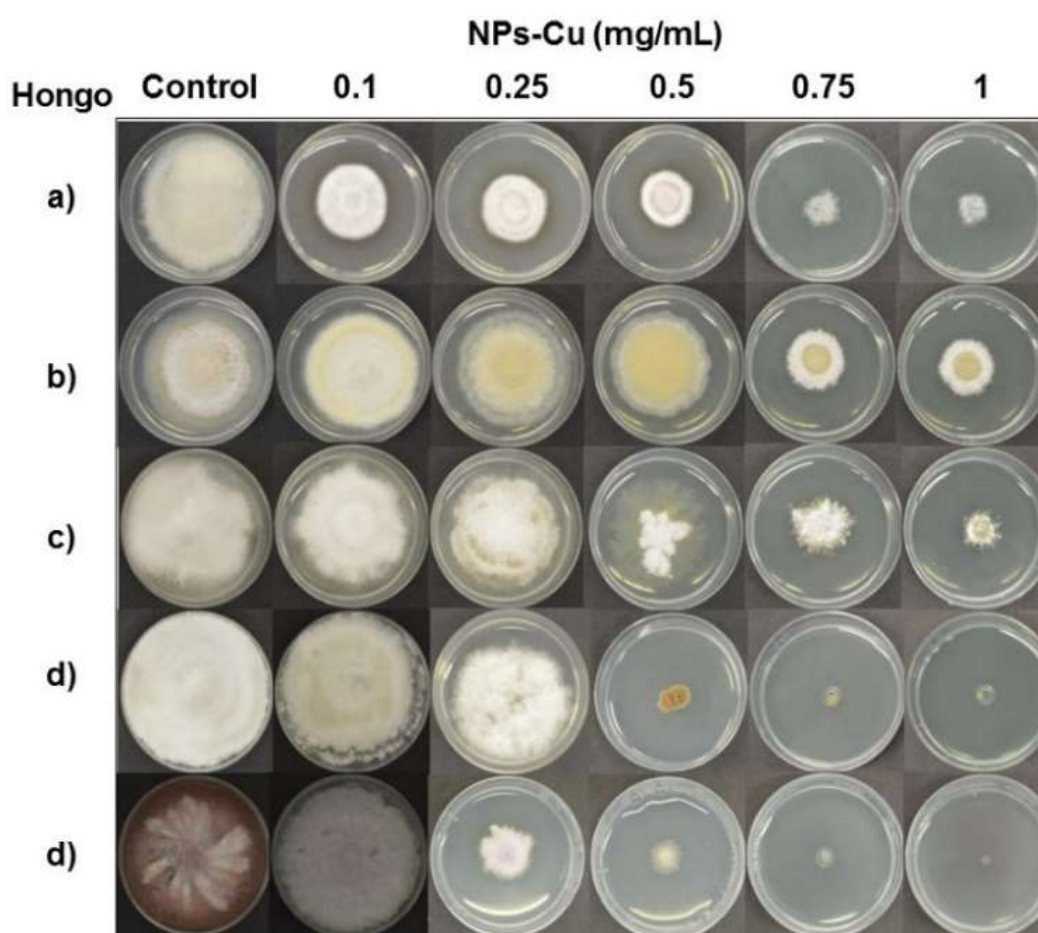


Figura 3: Evaluación de la actividad antifúngica de NPs-Cu contra diferentes cepas hongos fitopatógenos; a) *Fusarium solani*, b) *Fusarium verticillioides*, c) *Verticillium dahliae*, d) *Neofusicoccum sp* y e) *Fusarium oxysporum*.

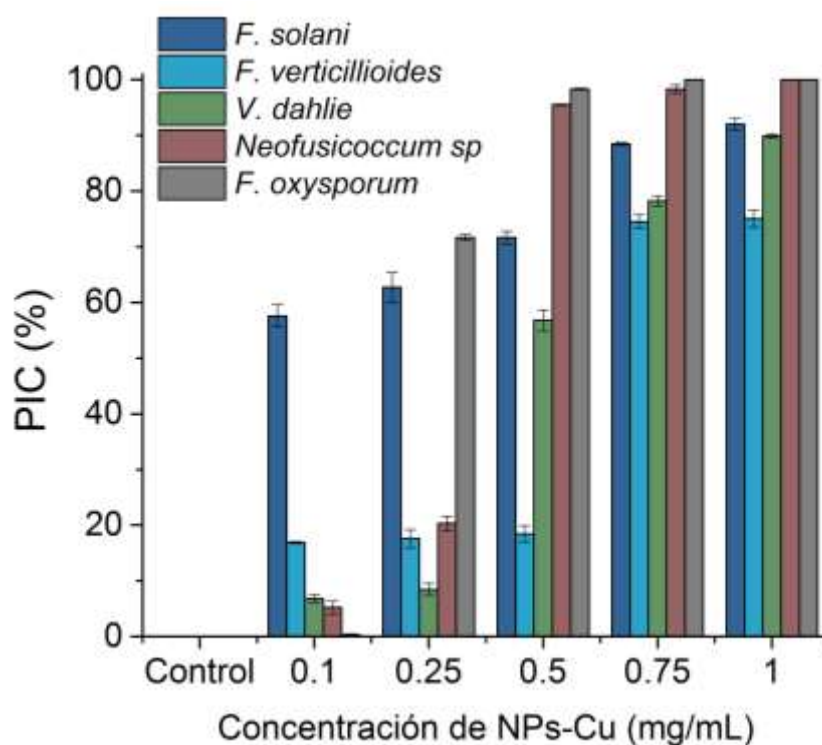


Figura 4: Porcentaje de inhibición de NPs-Cu contra las diferentes cepas hongos fitopatógenos.

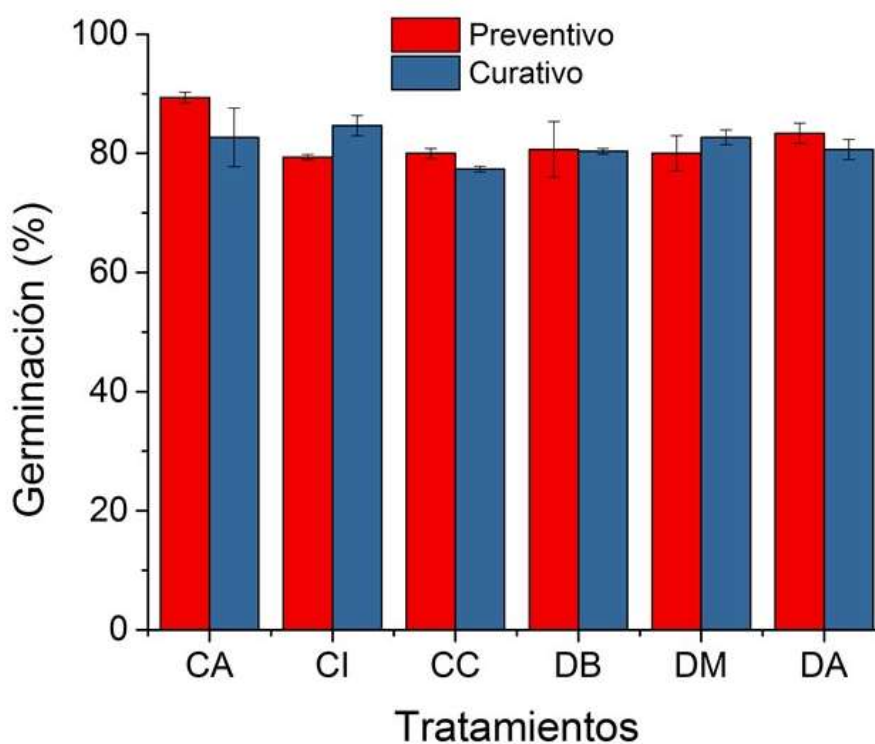


Figura 5: Porcentaje de germinación de las semillas de tomate con los diferentes tratamientos: CA=Control absoluto (sin el hongo y sin NPs-Cu), CI= Control positivo (con el hongo y sin NPs-Cu), CC=Control comercial (con el hongo y con fungicida comercial Cupravit), DB= Dosis baja (Con hongo y con 0.5 mg/mL de NPs-Cu), DM=Dosis media (Con hongo y con 0.75mg/mL de NPs-Cu) y DA=Dosis alta (Con hongo y con 1 mg/mL de NPs-Cu).

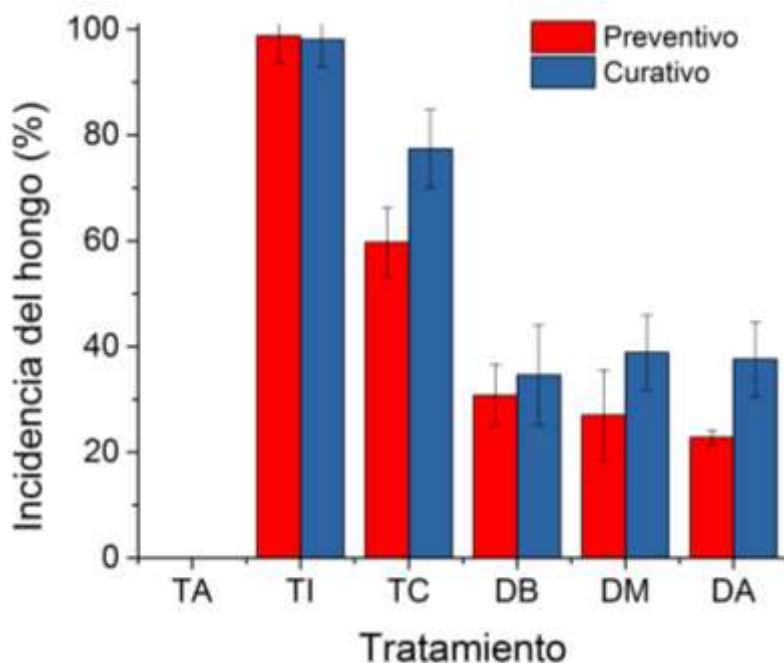


Figura 6: Porcentaje de incidencia del hongo (*F. oxysporum*) en plántulas de tomate con los diferentes tratamientos: CA=Control absoluto (sin el hongo y sin NPs-Cu), CI= Control positivo (con el hongo y sin NPs-Cu, CC=Control comercial (con el hongo y con fungicida comercial Cupravit), DB= Dosis baja (Con hongo y con 0.5 mg/mL de NPs-Cu), DM=Dosis media (Con hongo y con 0.75mg/mL de NPs-Cu) y DA=Dosis alta (Con hongo y con 1 mg/mL de NPs-Cu).

4. Conclusiones

Se encontró que la antifúngica de las NPs-Cu dependerá de la cepa de hongo y concentración. Así mismo, se observó que, en la evaluación en invernadero, el tratamiento con la NPs-Cu mostró un bajo porcentaje de incidencia del hongo fitopatógeno en las plántulas de tomate, comparado con el tratamiento comercial. Por lo tanto, las NPs-Cu tienen potencial aplicación en la agricultura para el control de hongos fitopatógenos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal (2015-C01-265677) de México.

Referencias

- [1] M.A. Garcia, Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 44 (2011) 20.
- [2] A.A. Rakhmetova, T.P. Alekseeva, O.A. Bogoslovskaya, I.O. Leipunskii, I.P. Ol, A.N. Zhigach, et al., Wound Healing Properties of Copper Nanoparticles as a Function of Physicochemical Parameters, *Nanotechnologies Russ.* 5 (2010) 271–276
- [3] J.S. Duhan, R. Kumar, N. Kumar, P. Kaur, K. Nehra, S. Duhan, Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture, *Biotechnol. Reports.* 15 (2017) 11–23.
- [4] M. Kurtjak, N. Anicic, M. Vukomanovic, Inorganic Nanoparticles: Innovative Tools for Antimicrobial Agents, *RFID Technol. Secur. Vulnerabilities, Countermeas.* (2013) 75–100
- [5] R. Raliya, V. Saharan, C. Dimkpa, P. Biswas, Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives, *J. Agric. Food Chem.* (2017).
- [6] P. Kanhed, S. Birla, S. Gaikwad, A. Gade, A.B. Seabra, O. Rubilar, et al., In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi, *Mater. Lett.* 115 (2014) 13–17.
- [7] N. Beyth, Y. Hourihaddad, A. Domb, W. Khan, R. Hazan, Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015 (2015) 16.

- [8] J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji, Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomater.* 4 (2008) 707–716
- [9] M. Eugenia de la Torre-Hernández, D. Sánchez-Rangel, E. Galeana-Sánchez, J. Plasencia-de la Parra, Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz, *Tip. Rev. Espec. En Ciencias Químico-Biológicas.* 17 (2014) 77–91.
- [10] R.G. Bhat, K. V Subbarao, Host range specificity in *Verticillium dahliae*, *Phytopathology.* 89 (1999) 1218–1225.
- [12] E. a Bush, E.P. Pathologist, V. Tech, *Botryosphaeria Canker and Dieback of Trees and Shrubs in the Landscape*, Virginia Coop. Ext. (2015) 450–726.
- [13] D. Nirmaladevi, M. Venkataramana, R.K. Srivastava, S.R. Uppalapati, V.K. Gupta, T. Yli-Mattila, et al., Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–14.
- [14] J. Ramyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikani, G. Rajakumar, A.A. Rahuman, Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles, *Mater. Lett.* 71 (2012) 114–116.
- [15] S. Wu, Preparation of fine copper powder using ascorbic acid as reducing agent and its application in MLCC, *Mater. Lett.* 61 (2007) 1125–1129.
- [15] O. Bondarenko, A. Ivask, A. Käkinen, A. Kahru, Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action, *Environ. Pollut.* 169 (2012) 81–89.
- [16] A.K. Chatterjee, R. Chakraborty, T. Basu, Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles., *Nanotechnology.* 25 (2014) 135101.

Email: nicolaza.pariona@inecol.mx,
conipariona@gmail.com