

**Evaluación, a escala laboratorio, del efecto ejercido por nanopartículas de óxido de titanio,
química y bioquímicamente sintetizadas, sobre el crecimiento del hongo *fusarium solani*
presente en el cultivo de palma de aceite**

Diana Marcela Vesga Guzmán

Proyecto de Trabajo de Grado

Directora

Ph.D. María Irene Kopytko

Universidad Pontificia Bolivariana

Facultad de Ingeniería Ambiental

Floridablanca

2018

Nota de Aceptación

Firma del Presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bucaramanga, mayo del 2018

Agradecimientos

Especialmente a Dios, por darme la resistencia y fortaleza de seguir adelante con mis propósitos, a pesar de las barreras que se me han presentado.

A mi familia por ser tan condicionales en cada momento de mi formación.

A mi directora María Kopytko por su entrega, amor, paciencia, confianza y apoyo en cada instante.

A los encargados de los laboratorios Naydu Villamizar, Diego Blanco, Alcides, Felicia y Jonathan, por la excelente disposición prestada en cuanto al uso de materiales, equipos, asesorías y reactivos de laboratorios.

A la Universidad Pontificia Bolivariana por brindarme la formación personal y profesional en todos los campos como Ingeniera Ambiental.

A Samuel Monclou por el apoyo moral y profesional en temas relacionados con mi proyecto de grado.

A la asesoría de la profesora Sandra Natalia Correa por la experiencia, atención y sugerencias que de una u otra manera me ayudaron a profundizar la investigación.

¡Gracias Totales!

Diana Marcela Vesga Guzmán

Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos	17
1.1 General	17
1.2 Específicos	17
2. Marco Teórico.....	18
2.1 Generalidades sobre las nanopartículas.....	18
2.2 Generalidades del Oxido de Titanio.....	19
2.3 Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas	21
2.3.1 Microscopia electrónica de barrido	22
2.4 Métodos químicos de síntesis de nanopartículas de TiO ₂	23
2.5 Caracterización del suelo	24
2.6 Palma De Aceite (<i>Elaeis guineensis</i>)	25
2.6.1 Descripción del cultivo de palma de aceite	29
2.7 Morfología microscópica y macroscópica del hongo <i>Fusarium solaní</i>	30
3. Metodología	32
3.1 Fase I: Caracterización de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, usando el extracto proveniente de las hojas de palma de aceite.....	34
3.1.1 Cromatografía de gases de las hojas de palma africana	34

3.1.2 Síntesis Bioquímica de nanopartículas de TiO ₂	34
3.1.3 Síntesis Química de nanopartículas de TiO ₂	35
3.2 Fase 2: Evaluación del efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, como agente antimicrobial.	36
3.2.1 Análisis fisicoquímicos del suelo de interés.	38
3.2.2. Inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solaní</i> presente el cultivo de palma	41
3.2.3. Aplicación de nanopartículas de TiO ₂ químicas y bioquímicas al suelo previamente esterilizado.	44
3.3 Fase 3: Comparación de la efectividad de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, sobre el crecimiento del hongo <i>Fusarium solaní</i>	46
4. Resultados y Análisis	47
4.1 Caracterización de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, usando el extracto proveniente de las hojas de palma de aceite.	47
4.1.1. Cromatografía de gases de las hojas de palma africana	47
4.2 Evaluación del efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, como agente antimicrobial.	53
4.2.1 Análisis fisicoquímicos de suelos de interés	53
4.2.1.1 Textura de los tres suelos de la finca Aurora	53
4.2.1.2 Determinación de pH y conductividad	55
4.2.1.3 Materia Orgánica	57
4.2.2 Inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solaní</i> presente en el cultivo de palma	58
4.2.3. Aplicación de nanopartículas de TiO ₂ químicas y bioquímicas en el suelo.	66

4.3 Comparación de la efectividad de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, sobre el crecimiento del hongo <i>Fusarium solani</i>	68
4.3.1 Análisis estadísticos de ensayos realizados	73
5. Conclusiones	78
6. Recomendaciones	80
Referencias Bibliográficas	81

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Formación de resina en el proceso de Pechini: Esterificación.	23
Figura 2. Representación microscópica del hongo <i>Fusarium solaní</i>	28
Figura 3. Morfología micro y macroscópicamente del hongo <i>Fusarium sp.</i> 3A: macroconidios de <i>Fusarium sp.</i> en aumento inmersión (100x). 3B: cultivo de <i>Fusarium proliferatum</i> en agar PDA. 3C: cultivo de <i>Fusarium proliferatum</i> en agar Sabouraud.	30
Figura 4. Metodología aplicada en el proyecto.....	33
Figura 5. Toma de submuestras de suelo en la finca Aurora	37
Figura 6. Método de cuarteo aplicado para las submuestras de suelo.	38
Figura 7. Diagrama de textura	40
Figura 8. Resumen de metodología aplicada para siembra del hongo <i>Fusarium solaní</i> en Agar Sabouraud con nanopartículas sintetizadas bioquímicamente.....	43
Figura 9. Ilustración de la verificación del crecimiento de hongo en el suelo.....	45
Figura 10. Cromatografía de Hojas de palma africana en modo Full Scan	50
Figura 11. Microscopia electrónica de barrido de las nanopartículas de TiO ₂ sintetizados químicamente.....	51
Figura 12. Microscopia electrónica de barrido de las nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas bioquímicamente.....	52

Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> en presencia de NPs sintetizadas químicamente a concentración de 100 ppm.	69
Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> en presencia de NPs sintetizadas bioquímicamente a concentración de 100 ppm.	69
Figura 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> en presencia de NPs sintetizadas químicamente a concentración de 200 ppm.	71
Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> en presencia de NPs sintetizadas bioquímicamente a concentración de 200 ppm.	71
Figura 17. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> en presencia de NPs sintetizadas químicamente a concentración de 400 ppm.	72
Figura 18. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> en presencia de NPs sintetizadas bioquímicamente a concentración de 400 ppm.	73
Figura 19. Análisis de varianza de crecimiento de hongo a diferentes concentraciones de NPs químicas y bioquímicas y el tiempo.....	74
Figura 20. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo a diferentes concentraciones de NPs químicas y bioquímicas y del tiempo.....	76

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Otros métodos de síntesis de nanopartículas	19
Tabla 2. Propiedades físicas del TiO ₂	20
Tabla 3. Características físico-químicas del suelo.....	24
Tabla 4. Enfermedades de la palma aceitera.....	26
Tabla 5. Información general del suelo para un buen cultivo de palma de aceite.	29
Tabla 6. Métodos empleados para análisis fisicoquímico de suelo de interés.....	39
Tabla 7. Resumen de tiempo y concentración aplicada en los experimentos con nanopartículas de TiO ₂ y Fusarium solaní.	44
Tabla 8. Identificación presuntiva, tiempo de retención y cantidad relativa de los componentes presentes en la hoja de palma africana.....	48
Tabla 9. Clasificación de textura en los suelos de interés.....	54
Tabla 10. Resultados pH para suelos providentes del cultivo de Palma.....	55
Tabla 11. Resultados de conductividad del suelo proveniente del cultivo de palma.....	56
Tabla 12. Resultados % Materia Orgánica	58
Tabla 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo Fusarium solaní, experimentada en una concentración de 100 ppm de NPs.	59
Tabla 14. Porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo Fusarium solaní, experimentada en una concentración de 200 ppm de NPs.	60

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> í, experimentada en una concentración de 400 ppm	62
Tabla 16. Registro fotográfico de la inhibición de crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> í con presencia de nanopartículas de TiO ₂ químicas en medio de cultivo Agar Sabouraud.....	64
Tabla 17. Registro fotográfico de la inhibición de crecimiento del hongo <i>Fusarium solan</i> í con presencia de nanopartículas de TiO ₂ bioquímicas en medio de cultivo Agar Sabouraud.	65
Tabla 18. Observación macroscópica y microscópica del hongo <i>Fusarium solan</i> í aplicado en el suelo con nanopartículas de TiO ₂	67
Tabla 19. Análisis de Varianza del diseño experimental factorial aplicado para el crecimiento del hongo.....	75
Tabla 20. Análisis de Varianza del diseño experimental factorial aplicado para la inhibición del crecimiento del hongo.....	77

Glosario

Extracto vegetal: Preparación que extrae sustancias útiles de las hojas de la palma africana.

Flavonoides: Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.

Fusarium solaní: Hongo asociado al proceso de infección de la pudrición del cogollo.

Medio de cultivo: Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Son esenciales en el Laboratorio de Microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Microscopia de electrónica de barrido (SEM): Proceso por el cual permite observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos.

Nanopartícula: Partícula con una dimensión menor que 100 nanómetros.

Óxido de titanio: Potente en procesos fotocatalítico y antibacterianos.

Palma de aceite: Cultivo oleaginoso que mayor cantidad de aceite produce por unidad de superficie.

Pudrición de Cogollo: Enfermedad más devastadora de la palma de aceite en América Latina, caracterizada por la pudrición de todos los nuevos tejidos.

Síntesis química: Proceso por el cual se obtienen compuestos químicos a partir de sustancia más simples.

Ultrasonido: Instrumento usado para dispersar las nanopartícula de plata y eliminar aglomeraciones.

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: EVALUACION, A ESCALA LABORATORIO, DEL EFECTO EJERCIDO POR NANOPARTICULAS DE OXIDO DE TITANIO, QUÍMICA Y BIOQUÍMICAMENTE SINTETIZADAS, SOBRE EL CRECIMIENTO DEL HONGO FUSARIUM SOLANÍ PRESENTE EN EL CULTIVO DE PALMA DE ACEITE

AUTOR(ES): Diana Marcela Vesga Guzmán

PROGRAMA: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): PhD. MARIA KOPYTKO

RESUMEN

En el presente proyecto se verificó el efecto ejercido por nanopartículas de óxido de titanio, química y bioquímicamente sintetizadas, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solan* presente en el cultivo de palma de aceite. Para este propósito se caracterizó las nanopartículas de óxido de titanio, y se evaluó el efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, como agente antimicrobial. Finalmente se comparó la efectividad de las nanopartículas de óxido de titanio, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solan*. Se evidenció que las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas químicamente y bioquímicamente ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solan* presente en el cultivo de palma de aceite. La observación por SEM de las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas químicamente, reveló su aglomeración semiesférica, con tamaño promedio de 12.30 nm y un alto grado de aglomeración, mientras que las sintetizadas bioquímicamente presentan forma esférica, con tamaño promedio de 14.60 nm y menor grado de aglomeración. El suelo con la enfermedad de pudrición de cogollo presenta la textura arenosa, que se diferencia de la clasificación Franco Arenosa y Arcillo Arenosa de los suelos sanos, creando déficit de humedad y nutrientes, lo cual con el bajo contenido de materia orgánica genera condiciones restrictivas para el cultivo de la palma. Un efecto 100% inhibitorio en el crecimiento del hongo imparten las nanopartículas de óxido de titanio a concentración de 400 ppm durante 3 días analizadas, mientras que las concentraciones bajas (100 ppm y 200 ppm) son 100% efectivas solo por dos primeros días. Las nanopartículas sintetizadas bioquímicamente presentan mejor efectividad para la inhibición del hongo, que las sintetizadas bioquímicamente. Análisis estadístico factorial 32 aplicado en ensayos, indica alta significancia de los dos factores analizados (concentración y tiempo), y de la interacción que hay entre ellos.

PALABRAS CLAVE:

Nanopartículas de óxido de titanio, *Fusarium solan*, síntesis química

V° B° DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: EVALUATION ON A LABORATORY SCALE OF THE EFFECT EXERTED BY NANOPARTICLES OF CHEMICALLY AND BIOLOGICALLY SYNTHESIZED TITANIUM OXIDE ON THE GROWTH OF THE FUNGUS FUSARIUM SOLANI PRESENT IN OIL PALM CULTIVATION

AUTHOR(S): Diana Marcela Vesga Guzmán

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: PhD. MARIA KOPYTKO

ABSTRACT

In the present project the effect exerted by nanoparticles of titanium oxide, chemically and biochemically synthesized, on the growth of the *Fusarium solani* fungus present in oil palm cultivation was verified. For this purpose, the nanoparticles of titanium oxide were characterized, and the effect of the titanium oxide nanoparticle synthesis methods was evaluated as an antimicrobial agent. Finally, the effectiveness of the titanium oxide nanoparticles on the growth of the *Fusarium solani* fungus was compared. It was evidenced that the nanoparticles of titanium oxide, synthesized chemically and biochemically exerted an inhibiting effect on the growth of the *Fusarium solani* fungus present in the oil palm culture. The observation by SEM of the chemically synthesized TiO₂ nanoparticles revealed its semispherical agglomeration, with an average size of 12.30 nm and a high degree of agglomeration, while those synthesized biochemically have a spheroidal shape, with an average size of 14.60 nm and a lower degree of agglomeration. The soil with the heart rot disease presents the sandy texture, which differs from the Sandy Grain and Sandy Clays classification of healthy soils, creating a deficit of moisture and nutrients, which with the low content of organic matter, restrictive conditions for the cultivation of the palm. A 100% inhibitory effect on the growth of the fungus imparts titanium oxide nanoparticles at a concentration of 400 ppm for 3 days analyzed, while low concentrations (100 ppm and 200 ppm) are 100% effective only for the first two days. The nanoparticles synthesized biochemically present better effectiveness for the inhibition of the fungus, than those synthesized biochemically. Factorial statistical analysis 3² applied in trials, indicates high significance of the two factors analyzed (concentration and time), and the interaction between them.

KEYWORDS:

Nanoparticles of titanium oxide - *Fusarium solani*- Chemical synthesis

V° B° DIRECTOR OF GRADUATE WORK

Introducción

El uso de los nanomateriales de óxido de titanio (TiO_2) ha sido un tema extenso en la investigación en la última década. Entre los temas de interés se encontraba la síntesis y aplicación de estos materiales. De igual manera se ha profundizado el conocimiento sobre sus propiedades para poder hacer uso de éstos. La literatura reporta gran cantidad de estudios que exploran la interacción del TiO_2 con la luz, aplicadas en semiconductividad, protección UV y actividades fotocatalíticas.

La actividad foto catalítica hace que este material sea adecuado para la descomposición de contaminantes ambientales. De la misma manera puede ocasionar la muerte de los microorganismos que atacan los cultivos. Entre estos se encuentra el hongo *Fusarium solani*, cual es uno de los causantes de la enfermedad de pudrición de cogollo (PC) en la palma africana.

La enfermedad de pudrición de cogollo (*Phytophthora palmivora*), se declaró como alerta peligrosa que puede conllevar a la muerte productiva a la palma de aceite, causando serio deterioro del sector palmicultor del departamento de Santander donde se encuentra la gran extensión de este cultivo. Esta situación es preocupante porque la producción de palma en Colombia se ha reducido de 4 toneladas por una hectárea por año, a 2 toneladas hectárea/año (ICA, 2013). Esta problemática genera pérdidas para algunas regiones en Colombia como el Puerto Wilches donde el panorama es devastador. Además, Fedepalma reporta que para el año 2013 quedan afectadas entre 10.000 a 15.000 personas, las cuales quedan sin empleo a nivel nacional (Fedepalma, 2015). Esto indica

pérdidas notorias en la parte económica del país, ya que Colombia se cataloga como uno de los países más estables en la producción de aceites comestibles y sus subproductos como: cosméticos, pinturas, jabones, detergentes, velas, biocombustibles entre otros (Fedepalma, 2017). Para solucionar este problema se ha buscado y aplicado distintas clases de pesticidas, lo cual en vez de controlar la plaga han introducido severos impactos ambientales.

Por lo anterior, el propósito de este proyecto fue comprobar el efecto antimicrobial que ejercen las nanopartículas de óxido de titanio sobre el hongo *Fusarium solaní*. Para este efecto se caracterizó las nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂), sintetizadas química y bioquímicamente. Posteriormente se comparó el crecimiento del hongo *Fusarium solaní* expuesto a las nanopartículas de TiO₂, sintetizadas de dos maneras, evaluándolos como agente antimicrobial.

De esta forma el proyecto buscó contribuir con la línea de investigación de nanopartículas aplicadas en campo de biorremediación.

1. Objetivos

1.1 General

Evaluar, a escala laboratorio, el efecto ejercido por nanopartículas de óxido de titanio, química y bioquímicamente sintetizadas, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solaní* presente en el cultivo de palma de aceite.

1.2 Específicos

- Caracterizar las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, usando el extracto proveniente de las hojas de palma de aceite.
- Evaluar el efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, como agente antimicrobial.
- Comparar la efectividad de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, que ejercen como efecto inhibidor sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solaní*.

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades sobre las nanopartículas

Una nanopartícula es una partícula microscópica con un tamaño o dimensión menor que 100 nm. En la actualidad las nanopartículas se aplican en amplia variedad de campos entre los cuales se puede citar cosmética, biomédica, óptica, electrónica, nano química y agricultura. El extenso uso de estos materiales se debe a su pequeño tamaño, cual permite interactuar de forma específica con las células, tejidos humanos, animales y estructuras químicas.

Las nanopartículas se puede clasificar por su diámetro. Las partículas ultra finas de las nanopartículas (Nps) poseen tamaño entre 1 y 100 nanómetros. Las partículas finas se encuentran en un rango de 100 a 2.500 nanómetros y las partículas gruesas tienen tamaño entre 2.500 y a 10.000 nanómetros.

Otra manera de clasificar las nanopartículas es como se obtienen. El método más común de síntesis de nanopartículas de TiO_2 es por medio de una ruta química. Para este proceso se utiliza el método de Pechini y Sol-gel, con el fin de garantizar la obtención de las propiedades deseadas en el producto final.

Otra técnica de síntesis es bioquímica por el método de extracto vegetal que contiene flavonoides y terpenos, los cuales son compuestos que facilitan la reducción.

Adicionalmente se puede ir especificando los métodos que se resumen en la tabla 1

Tabla 1.

Otros métodos de síntesis de nanopartículas

Métodos	Descripción
Evaporación térmica	Consiste en el calentamiento hasta la evaporación del material que se pretende depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en la que se condensa el vapor sobre una lámina fría requiriendo en todo momento un control preciso de las condiciones de crecimiento para no producir una modificación de la morfología de la capa depositada.
Deposito químico en fase de vapor	Consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), en o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas.
Método coloidal	Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante (un líquido en este caso). este rango de tamaño de partículas en una solución coloidal suele oscilar en el rango de nanómetros, por ello el método coloidal es un método eficiente de producción de nanopartículas

Fuente: (Betancur Henao, 2016)

2.2 Generalidades del Oxido de Titanio

El titanio es el primer elemento del bloque D de la tabla periódica, donde se encuentran los elementos de transición. Posee cuatro electrones de valencia ($3d^2 4s^2$) distribuidos en los orbitales

s y d, permitiendo el estado de oxidación más estable y común IV, con un enlace covalente (Cotton, 1973).

Este metal fácilmente se recombina con el oxígeno generando un óxido respectivo, cual tiene tres formas cristalinas: Rutilo, Anatasa y Brookita. Las dos primeras generan cristales tetragonales, mientras que la Brookita tiene forma cristalina romboédrica (Ver tabla 2). Estudios termoquímicos han demostrado que la Anatasa es de 2 kcal a 3 kcal más estable que el Rutilo, y la más estable del TiO_2 . (Cotton, 1973).

Tabla 2.

Propiedades físicas del TiO_2 .

	RUTILO	ANATASA	BROOKITA
Peso Molecular [g/mol]	79.89	79.89	79.89
Sistema Cristalino	Tetragonal	Tetragonal	Ortorrómico
Celda Unitaria			
a [Å]	45845	37842	9184
b [Å]			5447
c [Å]	29533	95146	5145
Volumen	62.07	136.25	257.38
Volumen molar [m³/mol]	18693	20156	19377
Densidad [kg/m³]	42743	3895	4123

Fuente: (Colorado, 2015)

La literatura reporta amplio uso de óxido de titanio cual explora sus propiedades ópticas, fotocatalíticas y antibacterianas. Las propiedades ópticas de esta sustancia han sido aplicadas en la elaboración de protectores UV. Su función fotocatalítica permite su uso en área ambiental para la

descomposición de metanotiol (CH_3SH) presente en aguas residuales y sólidos municipales. Las propiedades eléctricas de esta sustancia la clasifican como superhidrofóbica, lo cual permite su uso en materiales de auto limpieza o anti-empañamiento. Otra aplicación de gran importancia es su carácter bactericida entre las cuales se ha reportado efectividad de este compuesto en la eliminación de bacterias como la *E. coli* y las células tumorales en el cáncer. (Betancur Henao, 2016)

2.3 Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas se caracterizan generalmente por su tamaño, forma, superficie, área de la cara, y dispersión (Antibacterianas, 2015). En el proceso de identificación y caracterización de las nanopartículas, implica el método de la microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés), la cual es comúnmente la técnica más empleada en la determinación de forma, tamaño y distribución.

Además, para la caracterización de las nanopartículas metálicas se ha utilizado otras técnicas, que son espectrometría ultravioleta visible (UV-Vis), espectroscopia de energía dispersiva (EDS), espectrometría infrarroja (FIR) y Microscopia electrónico de barrido (SEM).

Cabe resaltar que no todas las nanopartículas responden de igual manera frente a estas técnicas.

2.3.1 Microscopia electrónica de barrido

El Microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM), es empleado para formar una imagen que efectúa un barrido sobre la superficie de un objeto usando un haz de electrones focalizados con mayor resolución con respecto al microscopio óptico en lugar de un haz de luz. El SEM permite la observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos. Tiene una gran ventaja en el momento de presentar las muestras, generando imágenes tridimensionales.

El equipo consta esencialmente de las siguientes partes:

- Una unidad óptica-electrónica, que genera el haz que se desplaza sobre la muestra.
- Una porta muestra, con distintos grados de movimientos.
- Una unidad de detección de las señales que se originan en la muestra, seguida de un sistema de amplificación adecuado.
- Un sistema de visualización de las imágenes (tubo de rayos catódicos).
- Un sistema de vacío, un sistema de refrigeración y un sistema de suministro eléctrico, relativamente similares a los del MET.
- Un Sistema de registro fotográfico, magnético o de video.

Los usos de las nanopartículas en las muestras ambientales requieren en muchas ocasiones estudios previos de la matriz en la cual se encuentran, como puede ser el suelo.

2.4 Métodos químicos de síntesis de nanopartículas de TiO₂

Los métodos químicos más usados para sintetizar dióxido de titanio son el depósito químico en fase de vapor, sol-gel y precursor polimérico o de Pechini.

La técnica sol-gel trasfiere a la formación de óxido de titanio por medio de reacciones inorgánicas poliméricas. Se utiliza especialmente para la elaboración de nanomateriales (óxido metálico). Los precursores pueden ser un metal alcóxido como un aluminato, titanio, borato, silicato, tiosulfato, entre otros. (Mosquera, Rosas, Debut, Guerrero, & Materiales, 2015).

El método Pechini (Mónica Andrea Vargas Urbano, Yasser Halil Ochoa Muñoz, Yamileth Ortegón Fernández, Patricia Mosquera, 2011) se le añade a una mezcla viscosa de ácido cítrico y etilenglicol en agitación continua, generando una disolución líquida transparente, como se ilustra en la figura 1(a). La quelación del catión se genera por la acción de la temperatura. El precursor que se utiliza es el Tetrabutoxido de Titanio.

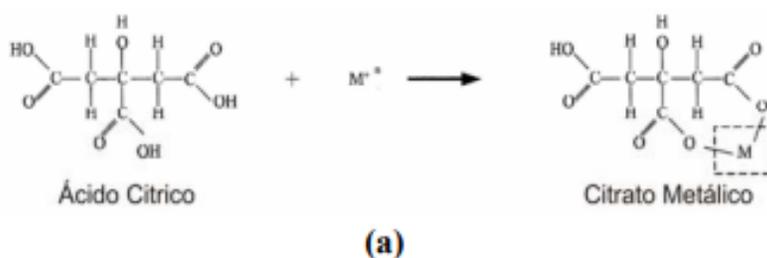


Figura 1. Formación de resina en el proceso de Pechini: Esterificación.

Fuente: (Thompson & Wiseman, 1989)

El método de depósito químico en fase vapor, conduce a una desintegración de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), el cual da lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas. (Zanella, 2012)

2.5 Caracterización del suelo

Las características físico-químicas del suelo influyen directamente en la aplicación y recuperación de las nanopartículas. En la tabla 3 se resumen las características más importantes de suelo.

Tabla 3.

Características físico-químicas del suelo

Características físicas del suelo	
Textura	Hace referencia al contenido de partículas de diferente tamaño, como la arena, el limo y la arcilla. Esta determina la cantidad de aire, agua que puede retener y la velocidad de infiltración.
Características químicas del suelo	
Materia orgánica	Procede de la descomposición de seres vivos y de la actividad biológica de los organismos, estos residuos metabólicos a lo que se denomina humus (UCLM, s.f.).
Capacidad de intercambio catiónico	Hace referencia al total de cargas negativas disponibles en la superficie del suelo, indica el potencial del suelo para retener e intercambiar nutrientes (SMART, s.f.).
pH	Propiedad química del suelo, cuantificable en la solución del mismo, por el contenido del ion hidronio, en donde a mayor proporción de hidrogeno, mayor acidez en el suelo. Otras fuentes de acidez del suelo son los iones de aluminio intercambiable, los grupos ácidos de la materia orgánica y los ácidos solubles (UNAD, s.f.).

Fuente: (Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite. & Centro de Investigación en Palma de Aceite., 1995)

Unas de las industrias agropecuarias con más interés en Colombia es el cultivo de la palma de aceite. Para ello es importante realizar análisis fisicoquímicos especificados en la tabla 3.

2.6 Palma De Aceite (*Elaeis guineensis*)

La palma de aceite es una planta tropical que crece en climas cálidos, por debajo de los 500 metros sobre el nivel del mar. En 1932, Florentino Claes fue quien introdujo la palma africana de aceite en Colombia. Inicialmente estas plantas fueron sembradas con fines ornamentales en la Estación Agrícola de Palmira (Valle del Cauca). A mediados del año 1945 las palmas de aceite fueron sembradas en Colombia ya con los fines comerciales y es cuando comenzó la actividad de United Fruit Company en Departamento de Magdalena. (Fedepalma, 2013)

La expansión del cultivo de la palma africana en Colombia ha mantenido un crecimiento sostenido hasta la última década. A mediados de 1960 existían 18.000 hectáreas en producción y en el año 2010 se registraron más de 360.000 hectáreas en 73 municipios del país. (Fedepalma, 2013)

Colombia cuenta con 58 núcleos palmeros, distribuidos en las cuatro zonas palmeras. La primera se ubica en la zona norte, con 97.881 hectáreas sembradas en la Costa y el Cesar. La segunda zona es central, donde se encuentran el Sur del Cesar, Bucaramanga y Norte de Santander que tienen 77.594 hectáreas sembradas. La zona oriental está compuesta por Departamento del Meta y Casanare con 106.317 hectáreas y el suroccidente abarca Tumaco y Caquetá con 34.610 hectáreas. (Fedepalma, 2013).

La palma aceitera (*Elaeis guineensis*) a través de los años ha venido siendo atacada por innumerables enfermedades que han afectado su crecimiento y producción. En la tabla 4 se especifican y describen cada uno de ellas.

Tabla 4.

Enfermedades de la palma aceitera

Tipo de la enfermedad	Descripción de la enfermedad
Fusariosis	La Fusariosis origina el hongo <i>Fusarium</i> cual en su fase inicial se identifica como <i>Fusarium solani</i> cual penetra en las raíces, desarrollándose en los vasos (xilema) de la planta, induciendo la aparición de gomas que obstruyen los vasos. Su origen proviene de África central y occidental. En América latina aparecieron dos focos de Fusariosis. Primero en Brasil en 1983 y el otro en el Ecuador en 1986, extendiéndose muy rápidamente en otros países como Colombia.
Pestalotiopsis	Pestalotiopsis es una enfermedad causada por los hongos <i>Pestalotia spp.</i> asociados con <i>Helminthosporium sp.</i> Estos hongos son considerados parásitos débiles, que aprovechan las heridas causadas por el daño mecánico o por insectos para atacar los tejidos de las hojas de palma aceitera. Su ataque en las épocas de sequía es escaso, pero continúa su desarrollo como saprofitos sobre los restantes vegetales de la planta. La enfermedad se expande en presencia de poblaciones elevadas de insectos masticadores y chupadores, así como las condiciones de alta temperatura, humedad relativa y luminosidad.
Anillo rojo	El anillo rojo es una enfermedad producida por el nematodo <i>Hadinaphelenchus cocophilus</i> y se transmite principalmente por el picudo <i>R.palmarum</i> . Su nombre se debe a la formación de un anillo de color pardo o crema de unos pocos centímetros de grosor en el tejido localizado cerca de la periferia del tronco. Generalmente las hojas nuevas son de un verde pálido amarillento y más cortas de lo normal.

Fuente:(Saenz, 2006)

Los estudios revelaron que estas enfermedades en la palma africana son iniciadas por un hongo denominado *Fusarium solaní*. En la actualidad existen varias hipótesis sobre la aparición de este hongo en los cultivos de Puerto Wilches. Algunas consideran que la pudrición de cogollo de la palma no se debe a la presencia del hongo *Fusarium solaní* si no a una descalcificación en la planta. Otros autores piensan que los periodos con alta precipitación y baja radiación solar conducen a la formación de este hongo. En varios reportes se indica que la aparición del hongo es consecuencia del efecto del cambio climático.(Laing, 2011).

Debido a que el *Fusarium* es el género que ha causado tanto impacto en el cultivo de palma, Los palmicultores crearon una asociación Cenipalma para promover la integración entre instituciones nacionales e internacionales, dedicados a los estudios sobre la enfermedad de palma de aceite y con la finalidad de avanzar rápidamente en la solución de la problemática.(Leon & Cuervo, 1995).

Adicionalmente, la alcaldía de Puerto Wilches, la Gobernación de Santander, el gremio de palmicultores, Fedepalma, Ministerio de Agricultura y otros entes han venido trabajando conjuntamente, para encontrar una solución del problema y de esta manera detener la expansión del hongo *Fusarium solaní*.

El *Fusarium solaní* produce esporas asexuales (micronidias y macronidias) Se alberga en los tejidos o semillas infectadas o muertas. Su propagación es por aire, equipo o agua. El hongo puede resistir en el suelo por varios años. Puede ser arrastrado por agua y contaminar otros cultivos. Produce clamidosporas que es la estructura de supervivencia en ausencia de una planta huésped. Por esta razón, es difícil su eliminación.(Luginbuhl, 2010).

En la figura 2 se puede observar la representación microscópica del hongo *Fusarium solaní*.



Figura 2. Representación microscópica del hongo *Fusarium solaní*.

Fuente: (Luginbuhl, 2010)

Cabe resaltar que la eliminación de esta plaga es sumamente difícil, ya que el hongo se desarrolla a gran velocidad, habitando en la palma como en el suelo. De esta manera el uso de herbicidas, el corte o incluso la incineración de la palma, resultan ser métodos insuficientes, calificando la pudrición de cogollo como una enfermedad de cultivo de palma africana. Además, la complejidad de esta temática se relaciona con biodiversidad de los organismos presentes en la zona, representados por innumerables especies que pueden ser afectadas, si se utilizan los tradicionales métodos de eliminación de este hongo (Cenipalma, 1992).

En consecuencia, de lo anterior la producción de aceite de palma se ha reducido notablemente y a su vez el mercado que depende de la comercialización del aceite se ha visto fuertemente afectado. Cenipalma aconsejó que la solución es reemplazar las plantas infectadas por híbridos que sean tolerantes al ataque del hongo, aunque para muchos, esto no representa una solución real.

La problemática se profundiza aún más si se tiene en cuenta la cantidad de familias que dependen de este cultivo.

2.6.1 Descripción del cultivo de palma de aceite

El cultivo de palma de aceite posee mayor rentabilidad económica en tierras bajas de las regiones tropicales. La producción de racimos es de 20 a 30 kilogramos por año, sin parar el corte de hojas que hace que el desarrollo de racimos aumente.

Las condiciones fisicoquímicas del suelo intervienen en el desarrollo de la palma de aceite, específicamente en zonas climáticas marginales. La palma resiste niveles bajos de acidez, hasta pH 4. El suelo es suelto y con buen drenaje. En la tabla 5 se presentan información técnica del suelo, lo cual favorece un buen cultivo de palma de aceite.

Tabla 5.

Información general del suelo para un buen cultivo de palma de aceite.

Clima	Tropical húmedo
Suelos	Los mejores suelos son los limosos, profundos y francos limosos. Se deben evitar suelos con texturas extrema especialmente arcillosos y arenosos. Requiere de suelos bien drenados que eviten que se lave el terreno y produzcan lixiviación de nutrientes.
pH	De 4.5- 7.5 óptimo, pero se adapta desde 3 a 8.2 niveles altos de calcio intercambiables puede ocasionar problemas en la absorción de cationes
Precipitación pluvial	Óptimo 1700- 2000 mm al año. 150 mm al mes. Precipitaciones mayores a 400 mm al mes durante julio a octubre, en precipitaciones menores a 1500 mm anuales se deben efectuar riegos complementarios en los meses más secos.
Temperaturas	23- 27 °C óptima, adaptable de 20-35 grados °C. Debajo de 19 °C son perjudiciales.
Luminosidad	1500-2000 horas luz por año.

Fuente: (MAGFOR, 2005)

2.7 Morfología microscópica y macroscópica del hongo *Fusarium solani*

La morfología microscópica del hongo *Fusarium solani* presenta la fiálide generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Todas las características son observables a un aumento de (40x). Existen distintos medios que permiten su crecimiento; entre ellos, agar papa dextrosa (PDA) y agar Sabouraud. Los agares PDA y Sabouraud permiten observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) difusible al medio (Figura 3B y 3C).

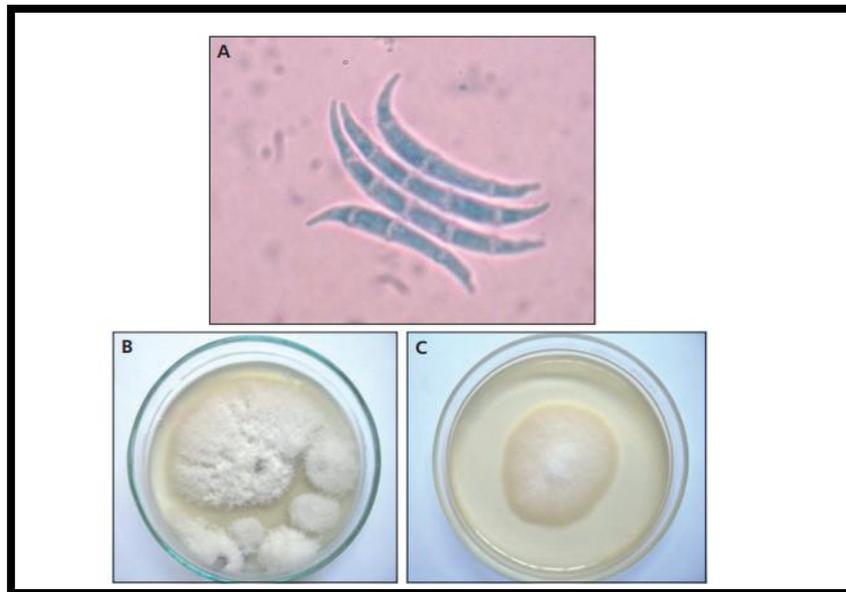


Figura 3. Morfología micro y macroscópicamente del hongo *Fusarium* sp. 3A: macroconidios de *Fusarium* sp. en aumento inmersión (100x). 3B: cultivo de *Fusarium proliferatum* en agar PDA. 3C: cultivo de *Fusarium proliferatum* en agar Sabouraud.

Fuente: (Microbiol, 2014)

3. Metodología

Para la ejecución del proyecto la metodología se desarrolló en 3 fases, establecidas por los objetivos específicos. El proyecto se realizó en el laboratorio de suelos y microbiología de la Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga. La toma de muestras de las hojas de palma de aceite y del suelo se ejecutó en la finca Aurora, ubicada $7^{\circ} 27' 081''$ N, $-73^{\circ} 580' 57''$ W, vía Puerto Wilches. Las hojas de la palma fueron cortadas de una palma joven. En cuanto al muestreo del suelo se aplicó el método aleatorio.

Para la finalización de la síntesis bioquímica y química de las nanopartículas se efectuó en laboratorio de Universidad de Cartagena, debido a la infraestructura necesaria que tiene este laboratorio.

A continuación, se indican las tres etapas del proyecto realizadas y en la figura 4 se resumen la metodología aplicada.

Fase I: Caracterización de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, usando el extracto proveniente de las hojas de palma de aceite.

Fase II: Evaluación del efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, como agente antimicrobial.

Fase III: Comparación de la efectividad de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, que ejercen como efecto inhibitor sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solaní*.

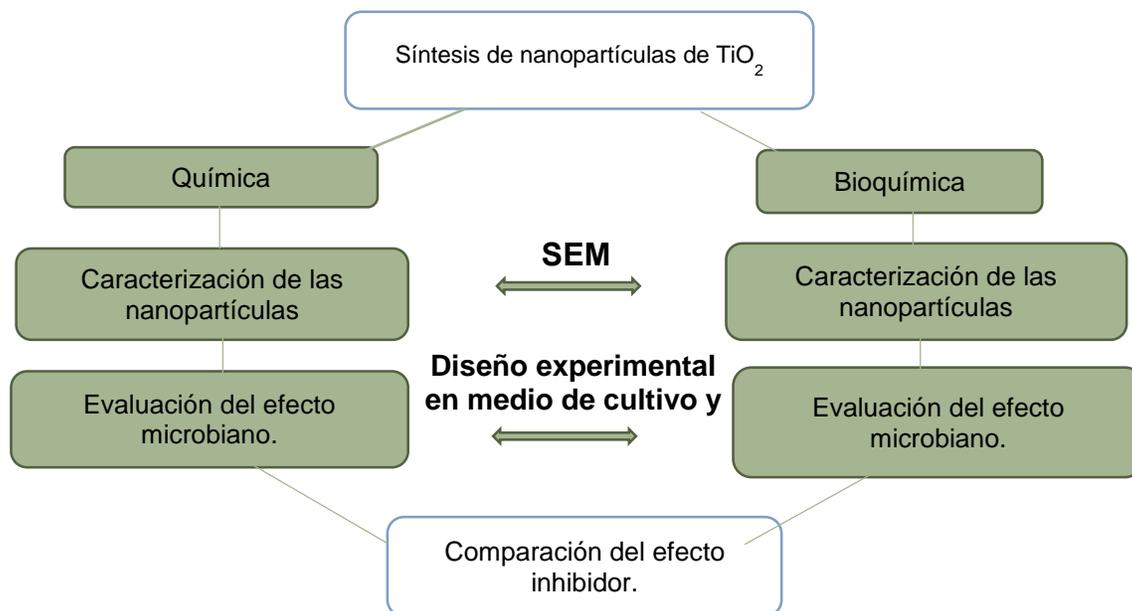


Figura 4. Metodología aplicada en el proyecto

Fuente: Autora

Inicialmente se realizó la síntesis de las nanopartículas y su caracterización para la cual se aplicó microscopio electrónico (SEM) para determinar la distribución y tamaño de las partículas. Posteriormente, se diseñaron los experimentos con el fin de ver el efecto de las nanopartículas sintetizadas bioquímica y químicamente en el crecimiento del hongo *Fusarium solaní* en suelos y medios de cultivo. Finalmente se compraron los resultados de inhibición de crecimiento del hongo bajo la influencia de las nanopartículas de titanio sintetizadas bioquímicamente y químicamente.

A continuación, se especifican los métodos aplicados en cada de las fases del proyecto.

3.1 Fase I: Caracterización de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, usando el extracto proveniente de las hojas de palma de aceite.

Antes de efectuar la caracterización de nanopartículas TiO_2 se realizó la síntesis de éstas por medio bioquímico y químico y la verificación de su formación para la síntesis bioquímica, lo cual se describe a continuación.

3.1.1 Cromatografía de gases de las hojas de palma africana

Se determinó la composición química de las hojas de palma africana por medio de cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases AT 6890, acoplada a un detector selectivo de masas, con el fin de verificar la presencia de terpenos y flavonoides. Para este análisis la extracción de las hojas se efectuó a través de la técnica micro extracción en fase sólida, en un monitoreo de fase vapor, en el que se empleó una fibra de sílice fundida cubierta con PDMS/DVB (Crommas, 2017).

3.1.2 Síntesis Bioquímica de nanopartículas de TiO_2

Para la síntesis bioquímica de las nanopartículas se utilizó el extracto acuoso de las hojas de palma, cual proporcionó flavonoides y terpenos, compuestos que cumplen la función de un agente reductor en reacción con óxido de titanio (TiO_2). Para la formación de óxido de titanio se utilizó 1.26 ml de tetrapropóxido de titanio $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)]_4$ y se le agregó 850 ml de agua destilada, sometiendo esta mezcla a una agitación con ultrasonido durante 30 minutos. Esta solución se

utiliza como agente precursor en síntesis de nanopartículas de óxido de titanio vía química y bioquímica.

En la formación bioquímica de nanopartículas se aplicó 85 ml de la solución de agente precursor con 15 ml del extracto de palma de aceite, dejándose en agitación magnética a 220 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente.

La solución obtenida se trasvasó a tubos de ensayo con rosca y se centrifugó a 5000 rpm, durante 15 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados de las nanopartículas que quedaron en el fondo de los tubos. Para este proceso se utilizó 6 ml de etanol, seguido con 6 ml de agua y 6 ml de etanol. Una vez lavadas las nanopartículas se dejó secarlas a temperatura ambiente. Por último, las nanopartículas se calcinarán a 550°C durante 4 horas en la mufla con el propósito de obtener la estructura cristalina cual contiene mayor porcentaje de fase anatasa.

3.1.3 Síntesis Química de nanopartículas de TiO₂

La síntesis química de las nanopartículas de TiO₂ se basó en método Pechini con ciertas modificaciones. Para ello, se mezclaron 21 ml de polietilenglicol y 17,5 gramos de ácido cítrico en proporción 4:1 a 70°C durante 20 minutos. Una vez enfriada la mezcla se le adicionó 5 ml de isopropóxido de titanio a la mezcla inicial con asistencia del ultrasonido.

Posteriormente, a la mezcla se le adicionaron 23 ml de hidróxido de amonio garantizando que la solución permanezca transparente con un pH básico entre 8,3 a 9. Después de esto se calentó la mezcla a 120°C entre 30 a 40 minutos 550 rpm, agitándose constantemente hasta que se formó una resina de color negro.

Finalmente, esa resina se calcinó a 400°C por 5 horas, hasta obtener una coloración blanca de las nanopartículas de TiO₂ en su fase anatasa.

Para remover los residuos de la resina se utilizó ácido clorhídrico al 1,5 M.

Una vez preparadas las nanopartículas por los dos métodos descritos anteriormente se caracterizaron mediante la microscopia electrónica de barrido (SEM).

3.2 Fase 2: Evaluación del efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, como agente antimicrobial.

Para la evaluación del efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solani* presente en el cultivo de palma de aceite, se diseñó experimentos utilizando el suelo de la finca Aurora y medio de cultivo Agar Sabouraud. Todos los ensayos se realizaron a escala de laboratorio manipulando para este efecto laboratorio de microbiología de la UPB, seccional Bucaramanga.

El muestreo de suelo se realizó aplicando el método indicado por CORPOICA, teniendo en cuenta tres tipos de suelos presentes en la misma finca, donde las muestras se diferenciaron por la coloración y textura (CORPOICA, 2013). Mientras los dos primeros suelos (S1 y S2) se ubicaban en la zona no afectada por la plaga, el S3 estaba en área contaminada. Los suelos S1 y S2 se diferenciaron por la distancia frente a S3, siendo el suelo S2 más cercano a la zona contaminada.

De la toma de muestra se seleccionó cada tipo de suelo para la toma de submuestras aplicando un patrón aleatorio y tomando en estos puntos las submuestras respectivas. Las submuestras se tomaron a 20 cm de profundidad, en cuatro puntos dispuestos diagonalmente alrededor de la palma. (Ver figura 5).



Figura 5. Toma de submuestras de suelo en la finca Aurora

Fuente: Finca Aurora, tomado diciembre 2017.

Una vez tomadas las submuestras se homogenizaron utilizando el método de cuarteo de muestra. Para este efecto se extendió el suelo sobre una bandeja limpia y se dividió en cuatro partes iguales guardando una parte la cual se volvió a mezclar y repetir el proceso hasta obtener 1Kg de peso final (Ver figura 6).



Figura 6. Método de cuarteo aplicado para las submuestras de suelo.

Fuente: Laboratorio de suelos UPB, tomado diciembre 2017.

3.2.1 Análisis fisicoquímicos del suelo de interés.

En la tabla 6 se resume las propiedades fisicoquímicas y el método empleado para su determinación. Cada parámetro se analizó por quintuplicado en laboratorio de suelos de la UPB.

Tabla 6.

Métodos empleados para análisis fisicoquímico de suelo de interés.

Parámetro	Método empleado
PH	*NTC 5264.
Textura	**ASTM WK38106 (Bouyoucos)
Carbono orgánico- Materia orgánica	*** I.N.V. E-121-07
Conductividad eléctrica	NTC 5596

*Normas Técnicas Colombianas

** American Society for Testing and Materials

*** Instituto Nacional de Vías

Fuente: (Soil Survey Staff, 2014)

Los parámetros seleccionados para análisis fisicoquímicos son los que inciden sobre el buen desarrollo del cultivo de palma de aceite.

Para la determinación de la textura del suelo afectado por los hongos, (S3) y del suelo sano (S2 y S1) en la finca Aurora se calculó los porcentajes de arena, arcilla y limo, aplicando la ecuación 1, 2 y 3.

Ecuación 1

$$\% \text{Arena: } 100 - \frac{1ra \text{ lectura corregida (40seg)} * 100}{\text{peso de la muestra en gramos.}}$$

Ecuación 2

$$\% \text{Arcilla: } \frac{2da \text{ lectura corregida (2horas)} * 100}{\text{peso de la muestra en gramos.}}$$

Ecuación 3

$$\% \text{Limo: } 100 - (\% \text{Arena} + \% \text{Arcilla})$$

Donde:

MO= Materia Orgánica

P₁= Peso crisol después del horno

P₂= Peso crisol después de la mufla

C= Peso del crisol

3.2.2. Inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solan* presente el cultivo de palma

Para la evaluación de inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solan*, se aplicó un diseño experimental 3², donde se establecieron dos factores (tiempo y concentración) a tres niveles cada uno y la variable de la respuesta fue el crecimiento del hongo. Los niveles de tiempo considerados fueron 1, 2 y 3 días y los niveles de la concentración de nanopartículas de óxido de titanio 100, 200 y 400 ppm. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado.

Al final se realizó un análisis estadístico comprando la hipótesis interactiva, la cual fue: la concentración de las nanopartículas de TiO₂ y el tiempo influye sobre la inhibición de crecimiento del hongo, siendo la hipótesis nula: la concentración de las nanopartículas de TiO₂ y el tiempo no influye sobre la inhibición de crecimiento del hongo.

Para evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo se tuvo en cuenta el diámetro del hongo que ha crecido en medio de cultivo, sin la influencia de nanopartículas (control) y el diámetro del hongo, cual se desarrolló bajo la influencia de las nanopartículas de TiO₂.

A diferencia de 5 repeticiones para cada concentración de nanopartículas, el control fue uno solo, como referencia de crecimiento de hongo *Fusarium solan* en ausencia de NPs y se aplicó en iguales condiciones como las muestras.

El cálculo de porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo se realizó aplicando la ecuación número 5.

Ecuación 5

$$\% I = \frac{DSN - DCN}{DSN} \times 100$$

I – Inhibición de crecimiento del hongo.

DCN – Diámetro del hongo cual creció con la presencia de nanopartículas

DSN – Diámetro del hongo cual creció sin la presencia de nanopartículas

En la figura 8 se ilustra la metodología aplicada para siembra del hongo *Fusarium solan* en Agar Sabouraud con nanopartículas sintetizadas bioquímicamente.

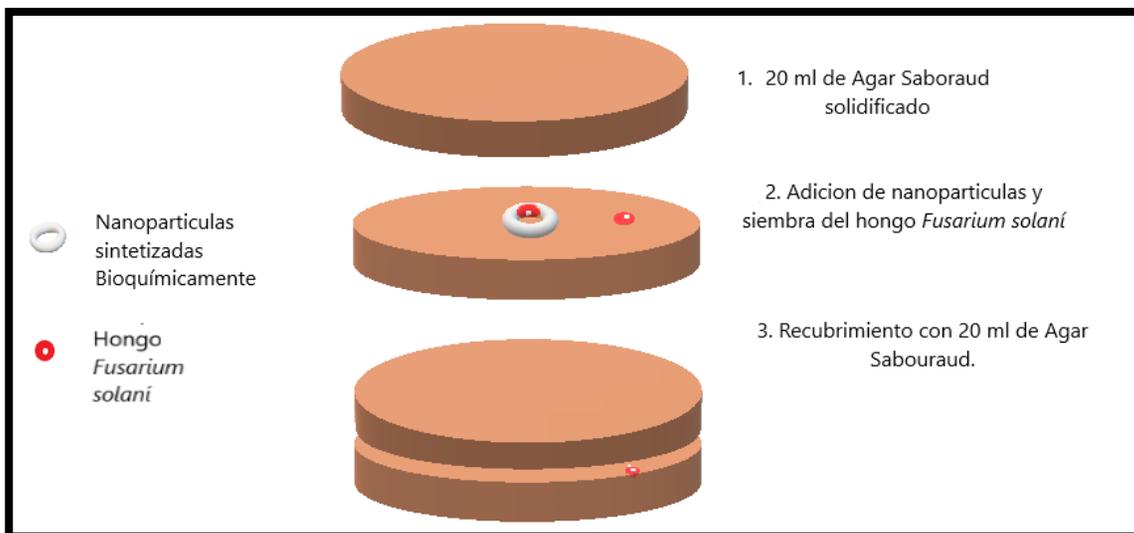


Figura 8. Resumen de metodología aplicada para siembra del hongo *Fusarium solani* en Agar Sabouraud con nanopartículas sintetizadas bioquímicamente.

Fuente: Autora

Al iniciar el proceso se adicionó en la caja Petri medio de Agar Sabouraud, cual una vez solidificado se le inoculo el hongo *Fusarium solani* en dos lugares de la misma caja. El primer lugar de inoculación fue en el centro, acompañado por adición directa de las nanopartículas y el otro lugar a una distancia aproximada de 2 cm del centro. Al finalizar el proceso se recubrió todo con la capa de Agar Sabouraud con igual grosor de la capa inferior.

La cantidad de nanopartículas aplicadas en los diferentes ensayos fue de 100, 200 y 400 ppm y la evaluación de la influencia de éstas sobre el crecimiento del hongo se realizó a 24 horas (1 día), 48 horas (2 días) y 72 horas de aplicación (3 días).

Una vez determinada la concentración de nanopartículas y el tiempo óptimo se procedió a la aplicación de esta condición en el suelo.

En la tabla 7 se resume el tiempo y concentración aplicada para la evaluación de crecimiento de hongo *Fusarium solani* bajo la influencia de las nanopartículas.

Tabla 7.

Resumen de tiempo y concentración aplicada en los experimentos con nanopartículas de TiO_2 y *Fusarium solani*.

	Medio de cultivo *	Medio de cultivo *	Medio de cultivo *
Concentración	100 ppm	200 ppm	400 ppm
Tiempos	1 día	1 día	1 día
	2 días	2 días	2 días
	3 días	3 días	3 días

* Agar Sabouraud

Fuente: Autora

3.2.3. Aplicación de nanopartículas de TiO_2 químicas y bioquímicas al suelo previamente esterilizado.

Para análisis de la influencia de las nanopartículas de óxido de titanio sintetizadas bioquímicamente y químicamente sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solani* en el suelo, se inició el proceso por la esterilización de la muestra tomada en campo (Finca Aurora).

Una vez finalizado este proceso se adicionó al suelo la solución de nanopartículas en cantidad optimizada anteriormente, añadiendo 40 ml del medio de cultivo líquido (Agar Sabouraud) y se aplicó el hongo *Fusarium solani* removiendo toda la mezcla para homogenizarla.

Después de los ocho días se tomó la muestra de suelo en cantidad de 10 gramos y se le adicionó 90 ml de peptona. A partir de esta solución se realizaron las siguientes diluciones: 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , las cuales se aplicaron en cantidad de 1 ml sobre la superficie sólida de Agar Sabouraud por separado, con el fin de evaluar el crecimiento del hongo (Ver figura 9).

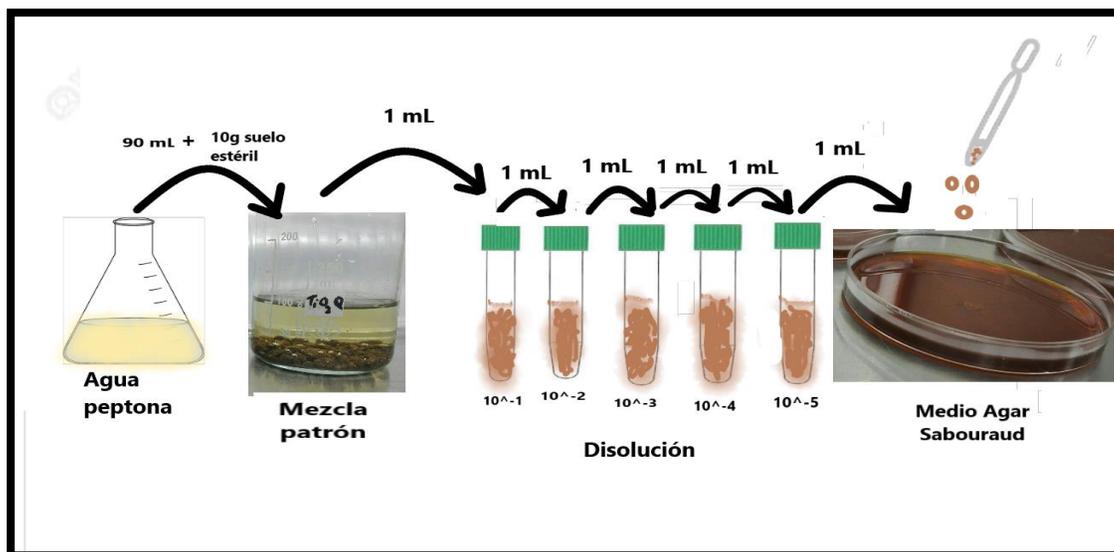


Figura 9. Ilustración de la verificación del crecimiento de hongo en el suelo.

Fuente: Autora

De Igual manera se realizó el proceso para las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas químicamente como las bioquímicamente. Las muestras que se sembraron en las cajas Petri se dejaron 8 días en incubación para el proceso de observación.

Para la comprobación de la presencia del hongo *Fusarium* se realizó la observación macroscópica y microscópica (aumento 40X), comparándolas con el tipo de hifas que describe para este hongo la literatura.

3.3 Fase 3: Comparación de la efectividad de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solani*.

Para realizar la comparación de la efectividad de las nanopartículas de TiO₂, sintetizadas química y bioquímicamente, se analizó el crecimiento del hongo en presencia de ambos tipos de nanopartículas, con el fin de seleccionar el método de mejor desempeño.

4. Resultados y Análisis

4.1 Caracterización de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, usando el extracto proveniente de las hojas de palma de aceite.

4.1.1. Cromatografía de gases de las hojas de palma africana

En la tabla 8 se demuestra la identificación presuntiva y la cantidad relativa (%) de los componentes presentes en las hojas de palma africana, bajo la información de las bases de datos Adams, Wiley y NIST.

Tabla 8.

Identificación presuntiva, tiempo de retención y cantidad relativa de los componentes presentes en la hoja de palma africana.

t_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa GC, %
		987311-01-BO "Hojas de palma de aceite"
11,67	Hexanal	1,2
14,02	3-Hexenol	4,1
18,88	Benzaldehído	1,3
19,54	1-Octen-3-ol	2,6
19,74	Metil heptenona	2,4
20,00	β-Mirceno	11,3
20,29	Heptadienal + Trimetilbenceno	0,8
20,40	Decano	1,2
20,94	Heptadienal	0,7
21,40	p-metil Anisol	0,7
21,61	p-Cimeno	6,2
21,82	Limoneno	2,0
21,92	Alcohol bencílico	1,8
22,37	Fenilacetaldehído	2,1
22,54	o-Cresol	0,5
23,01	γ-Terpineno	2,1
23,41	p-Cresol	0,7
23,52	cis-Óxido de Linalol (furanoide)	3,5
24,17	trans-Óxido de Linalol (furanoide)	2,1
24,60	Linalol	3,2

t_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa GC, %
		987311-01-BO "Hojas de palma de aceite"

24,79	Nonanal	0,5
24,93	Dimetil anisol	0,5
25,19	Alcohol feniletílico	4,3
26,45	4-Oxoisoforona + Dimetil-fenil	0,5
26,73	Isopulegol	0,5
27,28	Dimetoxi-benceno	3,2
27,48	<i>cis</i> -Óxido de linalol (piranoide)	0,4
27,61	<i>trans</i> -Óxido de linalol (piranoide)	0,5
28,18	Dodecene	0,7
28,26	Naftaleno	0,3
28,39	Salicilato de metilo	6,5
28,50	Dodecano	1,8
29,01	Dehidrobenzofurano	0,4
29,43	β -Ciclocitral	0,6
31,74	Timol	0,6
32,16	Tridecano	0,7
35,47	α -Copaeno	0,7
35,70	Tetradeceno	2,2
35,99	<i>n</i> -Tetradecano	1,4
36,34	Dodecanal	0,3
36,95	<i>trans</i> - α -Ionona	1,8
37,14	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0,3
37,38	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	0,7
<hr/>		
37,66	Geranil acetona	0,8
38,86	<i>trans</i> - β -Ionona	1,1
39,37	Pentadecano	0,7
39,59	α -Muuroleno	0,8
39,77	β -Bisaboleno	0,4
40,19	δ -Amorfeno	0,2
42,12	Hexadeceno	0,2
42,24	2-Etilhexanoato de 2-etilhexilo	0,7
42,33	Hexadecano	0,5
43,03	3,5- <i>di-tert</i> -Butil-4-hidroxipropiofenona	0,3
---	Fración correspondiente a hidrocarburos isoméricos en el rango de C₁₀ – C₂₅	14,9

Fuente: Crommas UIS (2017)

En la figura 10 se muestra los cromatogramas reconstruidos de la fase de vapor de las hojas de palma africana analizados por GC-MS operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia Full Scan.

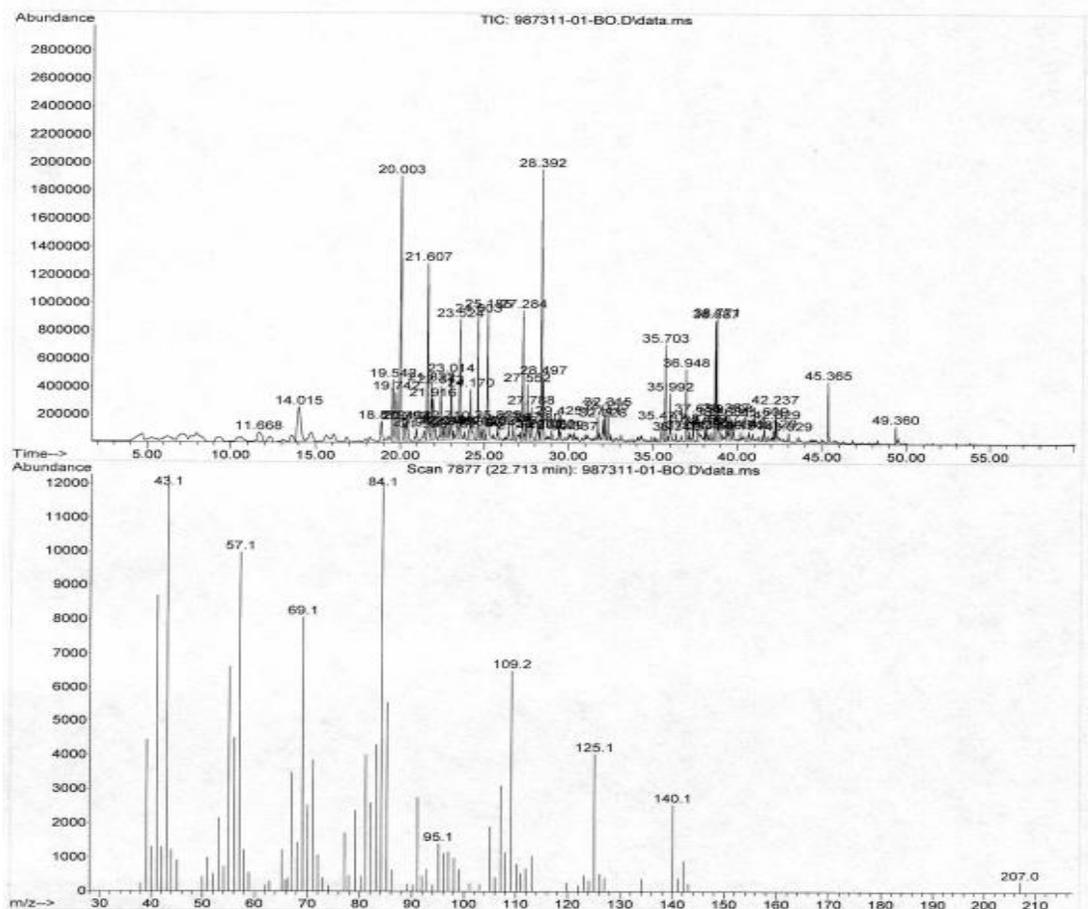


Figura 10. Cromatografía de Hojas de palma africana en modo Full Scan

Fuente: Crommas UIS (2017)

En la tabla 8 y figura 10 se verificó la presencia de flavonoides y terpenos esenciales para la formación de nanopartículas.

Después de haber sintetizado las nanopartículas de óxido de titanio se procedió a su caracterización, por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). En figura 11 se ilustran las nanopartículas sintetizadas químicamente y su respectivo tamaño.

La imagen obtenida presentó un aumento de 250X y con un voltaje de aceleración de electrones hasta 30 KV.

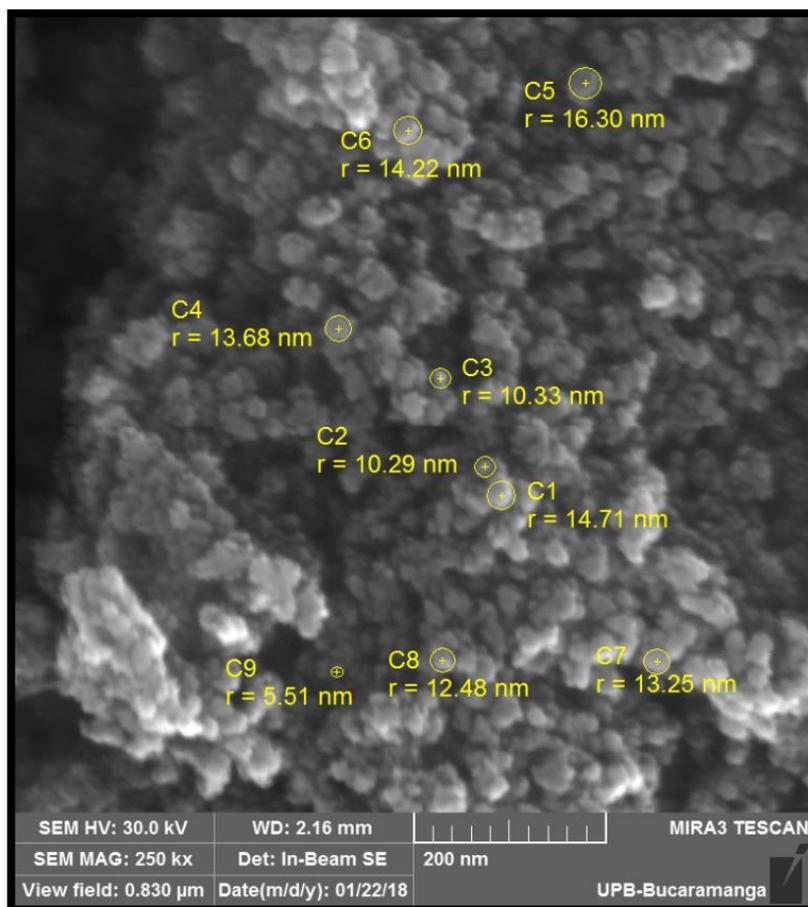


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas de TiO₂ sintetizados químicamente.

Fuente: SEM, Laboratorio de Nano ciencia y Nanotecnología. Universidad Pontificia Bolivariana – Bucaramanga

En la figura 11 se puede observar aglomeraciones semiesféricas con tamaño desde 5.51 nm a 16.30 nm aproximadamente. La oscilación del tamaño de la nanopartículas de óxido de titanio sintetizado químicamente fue de 12.30 nm

En la figura 12 se ilustran las nanopartículas sintetizadas bioquímicamente y su respectivo tamaño, donde la imagen obtenida presentó el mismo aumento y el voltaje, correspondiente a 250 X y 30 KV, respectivamente.

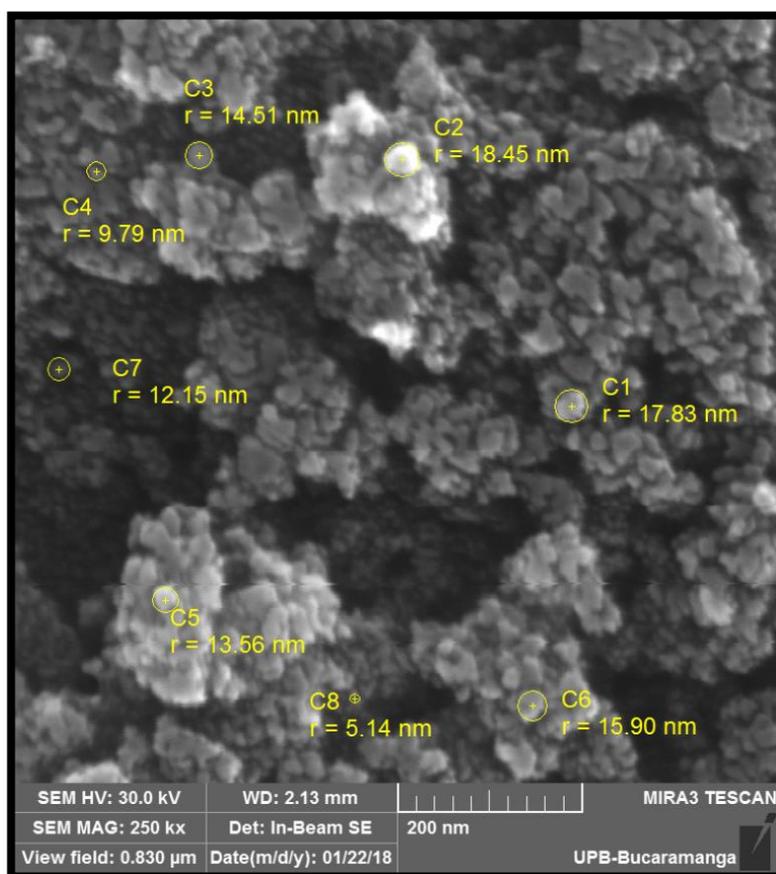


Figura 12. Microscopia electrónica de barrido de las nanopartículas de TiO₂ sintetizadas bioquímicamente.

Fuente: SEM, Laboratorio de Nanociencia y Nanotecnología. Universidad Pontificia Bolivariana – Bucaramanga

En la figura 12 se observa que las nanopartículas presentan forma esferoidal con menor aglomeración que las que sintetizaron químicamente con tamaño entre 5.14 nm a 18.45 nm. La

oscilación del tamaño de la nanopartículas de óxido de titanio sintetizado bioquímicamente fue de 14.60 nm.

Al comparar SEM de las nanopartículas sintetizadas químicamente con la que se sintetizaron bioquímicamente se observa el tamaño promedio mayor de las últimas.

La diferencia de 2 nm aproximadamente en tamaño y del grado de aglomeración de las nanopartículas sintetizadas bioquímicamente, podría ser la causa de influencia desigual en el crecimiento del hongo *Fusarium solaní*, que se observó durante la fase experimental.

4.2 Evaluación del efecto de los métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de titanio, como agente antimicrobial.

Después del muestreo se analizaron las propiedades fisicoquímicas del suelo afectado por los hongos, cuales causaron la pudrición de cogollo de la palma africana (S3) y de suelos sanos (S2 y S1) en la misma finca.

4.2.1 Análisis fisicoquímicos de suelos de interés

Los parámetros fisicoquímicos analizados para los tres suelos se especifican a continuación.

4.2.1.1 Textura de los tres suelos de la finca Aurora

Los porcentajes de arena, limo y arcilla junto con la clase textural del suelo S1, S2 y S3 se resuenen en la tabla 9.

Tabla 9.

Clasificación de textura en los suelos de interés

Textura- Bouyucos					
Suelo	Muestra	Contenido de los separados			Clase textural
		% Arena	% Limo	% Arcilla	
S1	1	85,44	7,56	7,00	Franco Arenoso
	2	83,44	6,32	10,24	Franco Arenoso
	3	83,44	6,06	10,52	Franco Arenoso
	4	82,64	5,86	11,51	Franco Arenoso
	5	82,44	7,54	10,02	Franco Arenoso
S2	1	81,08	7,56	11,36	Franco Arenoso
	2	81,68	6,82	11,51	Franco Arenoso
	3	81,68	6,96	11,36	Franco Arenoso
	4	85,08	8,06	6,86	Arenoso
	5	87,08	5,92	7,00	Arenoso
S3	1	86,94	7,56	4,58	Arenoso
	2	89,54	6,82	4,00	Arenoso
	3	91,72	6,96	4,00	Arenoso
	4	94,64	8,06	4,36	Arenoso
	5	90,58	5,92	4,36	Arenoso

Fuente: Autora

Los valores de porcentajes de arcilla, limo y arena, se aplicaron al diagrama Triangular para la clasificación del suelo, con lo cual se determinó la clase textural de cada uno. Como resultado, el suelo S1 se clasificó como Franco Arenoso, el S2 presenta variación de clase textural y el suelo S3 como el Arenoso. Mientras que el suelo S2 podría presentar una retención de la humedad por

el significativo porcentaje de arcilla, el S1 se le atribuye características como la alta capacidad de infiltración y drenaje rápido, lo cual genera el contenido bajo de humedad de estos.

Al comparar la cantidad de arcilla de los tres suelos se destaca alto porcentaje de esta en el suelo S2, seguido por el S1, y S3. El suelo S3 por ser contaminado por la enfermedad de PC, presenta una textura arenosa, la cual se relaciona con baja retención de agua y nutrientes, lo cual introduce condiciones precarias para el crecimiento de la palma. Esta diferencia textual del suelo contaminado puede ser ocasionada por las constantes fumigaciones necesarias por la presencia de la plaga.

4.2.1.2 Determinación de pH y conductividad

En la tabla 10 se presenta los resultados obtenidos de pH del suelo en H₂O y en KCl para los suelos de interés.

Tabla 10.

Resultados pH para suelos provenientes del cultivo de Palma.

Suelo	Promedio		
	pH en H ₂ O	pH en KCl	▲pH
S1	4,6	3,6	-0,8
S2	4,4	3,8	-0,6
S3	5,3	4,5	-0,7

Fuente: Autora

En la tabla 10 se evidencia mayor acidez en los suelos con ausencia del hongo *Fusarium solani* (S1 y S2), presentando deficiencia de los nutrientes. Esta consecuencia puede estar relacionado con la aplicación de los tipos de pesticidas y fertilizantes utilizados en los cultivos. Los fertilizantes más utilizados en la industria agropecuaria son: sulfato de amonio, nitrato de amonio y la urea. Esto puede generar un aumento de pH por una fertilización más exigente debido a la enfermedad de la palma y su debilitamiento.

Los valores de pH en KCl confirman la clasificación de suelos analizados bajo este parámetro, como los suelos extremadamente ácidos (S1 y S2), siendo el suelo S3 fuertemente ácido.

El resultado negativo de Δ pH indica que en los tres suelos predomina la carga negativa y por ende es un intercambiador catiónico.

Las conductividades eléctricas (CE) de los suelos analizados se reportan en la tabla 11.

Tabla 11.

Resultados de conductividad del suelo proveniente del cultivo de palma

Suelo	Muestra	Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$
S1	1	0,0859
	2	0,0865
	3	0,1065
	4	0,0955
	5	0,1076
Promedio		0,0964
S2	1	0,0807
	2	0,0705
	3	0,0714
	4	0,0807

Suelo	Muestra	Conductividad $\mu\text{S/cm}$
	5	0,0817
	Promedio	0,0770
S3	1	0,1015
	2	0,0379
	3	0,0303
	4	0,0585
	5	0,0429
	Promedio	0,0542

Fuente: Autora

La conductividad del suelo S1 y S2 es mayor que la del S3, lo cual indica que en los primeros suelos hay mayor cantidad de minerales disueltos. Se podría considerar que la constatación de la fumigación del suelo S3 elimina gran parte de sales disueltas en este suelo, debido a que es un suelo no salino.

Los valores de conductividad eléctrica menores a 1 mmho/cm, indican que el cultivo de palma de aceite es susceptible a suelos no salinos, la conductividad eléctrica debe ser menor de 1 y es susceptible a suelos sódicos.

4.2.1.3 Materia Orgánica

En la tabla 12 se reportan los resultados de la materia orgánica calculados para suelos de interés.

Tabla 12.

Resultados % Materia Orgánica

Muestra	Promedio - % MO
S1	2.21
S2	3.08
S3	1.93

Fuente: Autor

En la tabla 12 se puede observar que los suelos no contaminados (S1 y S2) presentan mayor porcentaje de la materia orgánica con respecto al suelo en la zona afectada por los hongos de pudrición de cogollo. Esto señala el deterioro del suelo S3, causado por las constantes fumigaciones y la plaga que lo afecta.

De igual manera se puede ver coherencia entre contenido de la materia orgánica del suelo S3 que es arenoso y la baja cantidad de materia orgánica que a este corresponde.

4.2.2 Inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solani* presente en el cultivo de palma

Aplicando el diseño experimental 3^2 se tomó los valores de crecimiento del hongo correspondiente a los factores y sus niveles considerados.

El tiempo de contacto y las concentraciones de nanopartículas, relacionadas con el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo se presenta en las tablas 13, 14 y 15.

Tabla 13.

Porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo *Fusarium solani*, experimentada en una concentración de 100 ppm de NPs.

Tiempo (días)	Tipo NPs	Concentración (ppm)	*DCN [mm]	**DSN [mm]
Día 1	NPS Químicas	100	0	18
			0	18
			0	18
			0	18
			0	18
	NPS Bioquímicas		0	18
			0	18
			0	18
			0	18
			0	18
Día 2	NPS Químicas	100	0	55
			0	55
			0	55
			0	55
			0	55
	NPS Bioquímicas		0	55
			0	55
			0	55
			0	55
			0	55
Día 3	NPS Químicas	100	5	80
			13	80
			14	80
			3	80
			11	80
	Promedio		9,2	80
	NPS Bioquímicas		0	80
			0	80
			0	80
			0	80
17		80		
Promedio	3,4	80		

*DCN – Diámetro del hongo con presencia de NPs de TiO₂.

**DSN - Diámetro del hongo sin presencia de NPs de TiO₂.

Fuente: Autora

En la tabla 13 se puede observar el nulo crecimiento del hongo *Fusarium solan* en presencia de los dos tipos de nanopartículas de TiO₂, a la concentración de 100 ppm en los dos primeros días.

Al tercer día, el crecimiento promedio del hongo en presencia de nanopartículas sintetizadas químicamente fue de 9,2 mm de diámetro en promedio con respecto a 80 mm que presentó el crecimiento del hongo en caja de control (con ausencia de NPs). Esto representa un 11,5 % de crecimiento del hongo con respecto a la referencia y la respectiva inhibición de 88,5 % generada por la presencia de NPs de TiO₂.

En cuanto a las NPs sintetizadas bioquímicamente, su crecimiento promedio en el tercer día fue de 3,4 mm con respecto al control (80 mm). Esto representó el crecimiento del hongo en 4,25% con respecto a la referencia y su respectiva inhibición de 95,75%

Tabla 14.

Porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo Fusarium solan, experimentada en una concentración de 200 ppm de NPs.

Tiempo	Tipo NPs	Concentración	*DCN [mm]	**DSN [mm]
Día 1	NPS Químicas	200	0	18
			0	18
			0	18
			0	18
			0	18
	NPS Bioquímicas	200	0	18
			0	18
			0	18
			0	18
			0	18
Día 2	NPS Químicas	200	0	55
			0	55

Tiempo	Tipo NPs	Concentración	*DCN [mm]	**DSN [mm]		
Día 3	NPS Bioquímicas	200	0	55		
			0	55		
			0	55		
			0	55		
			0	55		
			0	55		
			0	55		
			0	55		
	NPS Químicas	200	36	80		
			6	80		
			9	80		
			7	80		
			38	80		
			Promedio	19,2	80	
			NPS Bioquímicas	200	0	80
					0	80
0	80					
0	80					
Promedio	18	80				
Promedio	3,6	80				

DCN – Diámetro del hongo con presencia de NPs de TiO₂.

**DSN - Diámetro del hongo sin presencia de NPs de TiO₂.

Fuente: Autora

De manera semejante como se comportaron las NPs sintetizadas químicamente y bioquímicamente a 100 ppm. Los dos primeros días las NPs a 200 ppm impidieron el crecimiento total del hongo *Fusarium solani*.

Al tercer día, el crecimiento promedio del hongo en presencia de nanopartículas sintetizadas químicamente fue de 19,2 mm de diámetro en promedio con respecto a 80 mm que presentó el crecimiento del hongo en caja de control (con ausencia de NPs). Esto representa un 24 % de

crecimiento del hongo con respecto a la referencia y la respectiva inhibición de 76 % generada por la presencia de NPs de TiO₂.

En cuanto a las NPs sintetizadas bioquímicamente, su crecimiento promedio en el tercer día fue de 3,6 mm con respecto al control (80 mm). Esto representó el crecimiento del hongo en 4,5% con respecto a la referencia y su respectiva inhibición de 95,5%.

Analizando los datos anteriores se puede ver un semejante crecimiento del hongo bajo la influencia de las NPs sintetizadas bioquímicamente a 100 ppm como a 200 ppm. En contraste de las NPs sintetizadas químicamente, se genera una notable diferencia en el crecimiento del hongo, lo cual podría ser relacionado con su menor tamaño y mayor aglomeración que las otras.

Tabla 15.

Porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo Fusarium solaní, experimentada en una concentración de 400 ppm

Tiempo	Tipo NPs	Concentración	*DCN [mm]	**DSN [mm]
Día 1	NPS Químicas	400	0	18
			0	18
			0	18
			0	18
			0	18
	NPS Bioquímicas		0	18
			0	18
			0	18
			0	18
			0	18
Día 2	NPS Químicas	400	0	55
			0	55
			0	55

Tiempo	Tipo NPs	Concentración	*DCN [mm]	**DSN [mm]
Día 3	NPS Bioquímicas	400	0	55
			0	55
			0	55
			0	55
			0	55
			0	55
	NPS Químicas	400	0	80
			0	80
			0	80
			0	80
	NPS Bioquímicas	400	0	80
			0	80
			0	80
			0	80

DCN – Diámetro del hongo con presencia de NPs de TiO₂.

**DSN - Diámetro del hongo sin presencia de NPs de TiO₂.

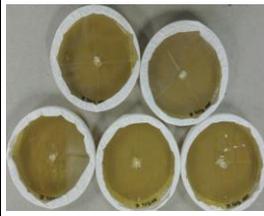
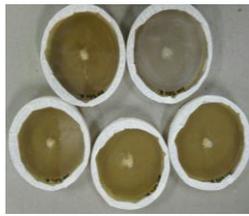
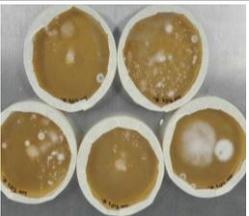
Fuente: Autora

A una concentración de 400 ppm de NPs se observa un crecimiento nulo del hongo *Fusarium solaní* en ambos tipos de nanopartículas aplicadas.

En la tabla 16 se resumen el registro fotográfico cual confirma la inhibición de crecimiento de hongo señalada anteriormente.

Tabla 16.

Registro fotográfico de la inhibición de crecimiento del hongo *Fusarium solan* con presencia de nanopartículas de TiO_2 químicas en medio de cultivo Agar Sabouraud.

Tiempo(días)	Nanopartículas Químicas			Control
	Concentración(ppm)			
	100	200	400	
1				
2				
3				

Fuente: Autora

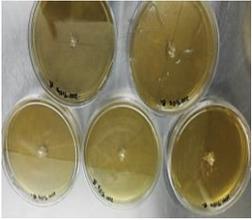
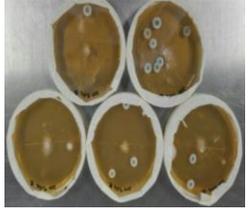
En la tabla 16 se puede observar un pleno crecimiento (80mm) del hongo en las cajas Petri de control y la inhibición de *Fusarium solan* en las otras cajas. Las concentraciones bajas (100 y 200 ppm) de las nanopartículas de TiO_2 pueden generar el desarrollo del hongo después del segundo día a cierta distancia del centro, donde éstas se adicionaron. Además, se observó después del segundo día una contaminación cruzada, generada por el ambiente.

En contraste, la alta concentración (400 ppm) inhibe totalmente el crecimiento del hongo *Fusarium solan* y los demás hongos del ambiente, por lo tanto, fue seleccionada para la aplicación en el suelo.

En la tabla 17 se presenta registro fotográfico de la inhibición de crecimiento del hongo *Fusarium solan* con presencia de nanopartículas de TiO_2 bioquímicas en medio de cultivo Agar Sabouraud.

Tabla 17.

Registro fotográfico de la inhibición de crecimiento del hongo *Fusarium solan* con presencia de nanopartículas de TiO_2 bioquímicas en medio de cultivo Agar Sabouraud.

Tiempo(días)	Nanopartículas Bioquímicas Concentración(ppm)			Control
	100	200	400	
1				
2				
3				

Fuente: Autora

En la tabla 16 se visualiza en el control el aspecto macro del hongo *Fusarium solan*, con una tendencia a crecer desde el primer día en medio de cultivo Agar Sabouraud en ausencia de nanopartículas.

Las demás cajas Petri presentan un comportamiento semejante a las reportadas en la tabla 15, donde la concentración baja (100 y 200 ppm) permite el crecimiento del hongo *Fusarium solan* y los demás hongos del ambiente a partir del tercer día.

La alta concentración (400 ppm) inhibe en 100 % el crecimiento del hongo de interés, así como protege de la contaminación cruzada por hongos del ambiente.

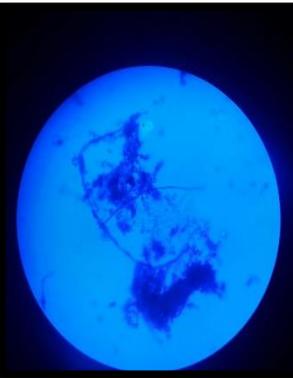
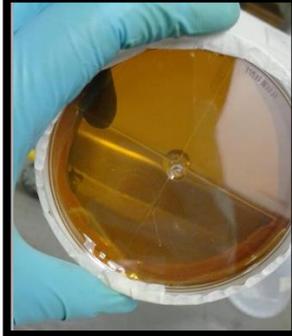
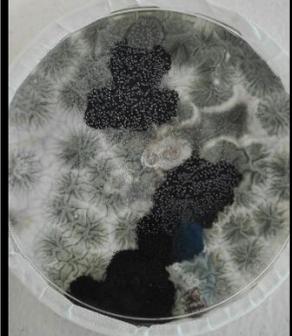
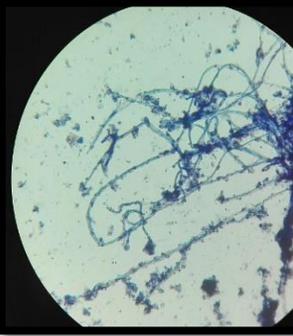
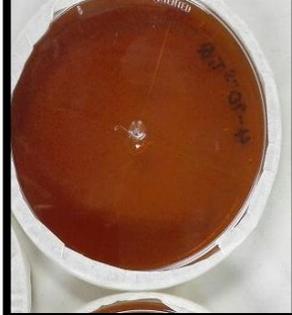
Con base a los resultados anteriores se seleccionó la concentración de 400 ppm de nanopartículas de TiO_2 para realizar los ensayos en el suelo.

4.2.3. Aplicación de nanopartículas de TiO_2 químicas y bioquímicas en el suelo.

En la tabla 18 se ilustran las observaciones macroscópicas y microscópicas del hongo *Fusarium solan*, aplicado en el suelo con nanopartículas de TiO_2 .

Tabla 18.

Observación macroscópica y microscópica del hongo Fusarium solaní aplicado en el suelo con nanopartículas de TiO₂.

Disolución del suelo	Observación Macroscópica		Observación microscópicamente
	Día 0	Día 8	
<i>Control</i>			
<i>Nanopartículas de TiO₂, sintetizadas bioquímicamente</i>			
<i>Nanopartículas de TiO₂, sintetizadas químicamente</i>			

Fuente: Autora

Mediante la observación microscópica se puede comprobar las características del hongo *Fusarium solaní* observándolas en el centro de la imagen ampliada de la caja Petri de control. Se

puede ver la presencia de hifas hialinas septadas, macroconidias multicelulares en perfil de banana o canoa que se aglomeran en forma de globos, así como clamidosporas que son formas de resistencias que posee el hongo.

Aunque en la observación macroscópica de la solución de suelo con las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas química y bioquímicamente, aparecen unos hongos generados por el ambiente con morfologías de *Rhizopus rhizopodimofi* observadas con azul de lactofenol a un aumento de (40x), sus hifas son aseptadas, abundantes rizoides, las endosporas son vellosas, y secas. Por consiguiente, no poseen las mismas características que tiene *Fusarium solaní*.

4.3 Comparación de la efectividad de las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas química y bioquímicamente, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solaní*.

A partir de los resultados anteriores sobre la evaluación de inhibición de crecimiento del hongo *Fusarium solaní*, se procedió a comparar la efectividad de las nanopartículas de TiO_2 , sintetizadas química y bioquímicamente, con el fin de observar la mejor incidencia que éstas poseen.

En la figura 13 y 14 se puede analizar el comportamiento de las nanopartículas de TiO_2 químicas y bioquímicas respectivamente, bajo la misma concentración de 100 ppm.

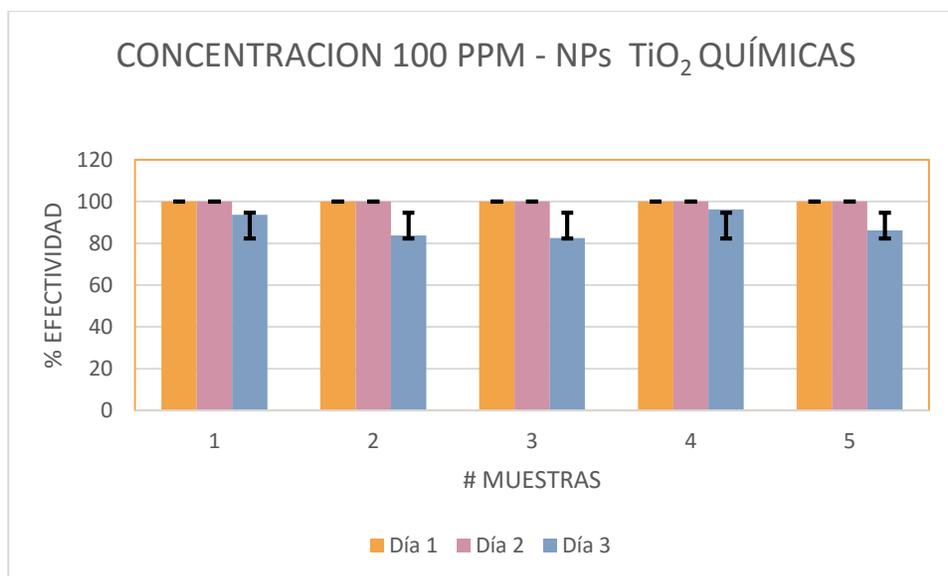


Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solani* en presencia de NPs sintetizadas químicamente a concentración de 100 ppm.

Fuente: Autora

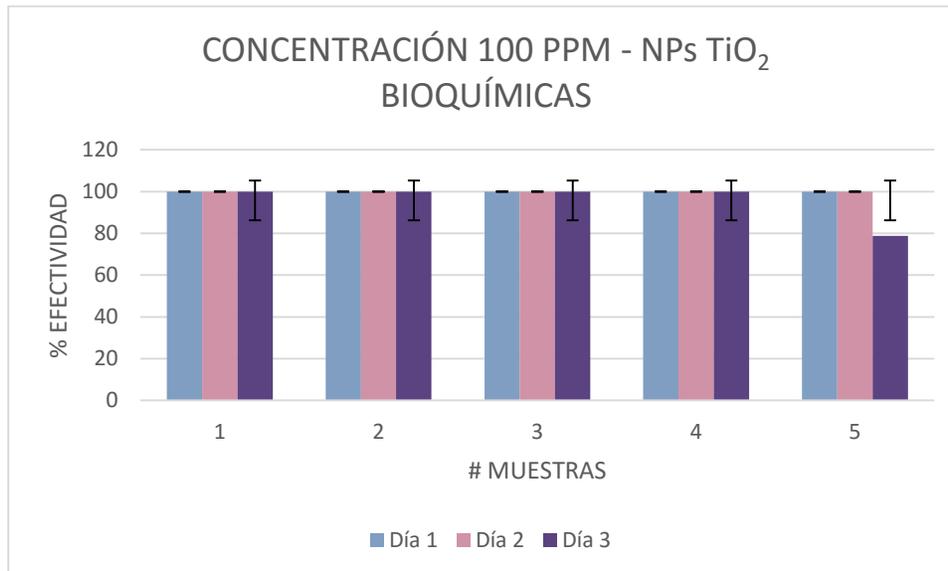


Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solani* en presencia de NPs sintetizadas bioquímicamente a concentración de 100 ppm.

Fuente: Autora

Los resultados de la figura 13 y 14 demuestran el efecto inhibitor del crecimiento del hongo que ejercen las NPs de TiO₂, sintetizadas químicamente y bioquímicamente, lo cual se manifiesta en un 100% de efectividad, presentado hasta el segundo día en ambos casos. Después de este tiempo, en el tercer día, el hongo inició su desarrollo correspondiente a un 88,05% en promedio, con las Nps sintetizadas químicamente y un 95,75% en promedio, en presencia de las NPs sintetizadas bioquímicamente.

Al comparar la efectividad de las nanopartículas químicas con las bioquímicas se observa mayor efectividad de las NPs de TiO₂ sintetizadas bioquímicamente.

Vale la pena resaltar que en la fase experimental se observó que el hongo *Fusarium solan* desarrolló un proceso de defensa, cual consistió en un crecimiento en torno a las nanopartículas. Esto privó las NPs de TiO₂ de la luz, inhabilitando proceso fotocatalítico, cual es responsable por la reducción del crecimiento del hongo.

En la figura 15 y 16 se puede analizar el comportamiento de las nanopartículas de TiO₂ químicas y bioquímicas respectivamente, bajo la misma concentración de 200 ppm.

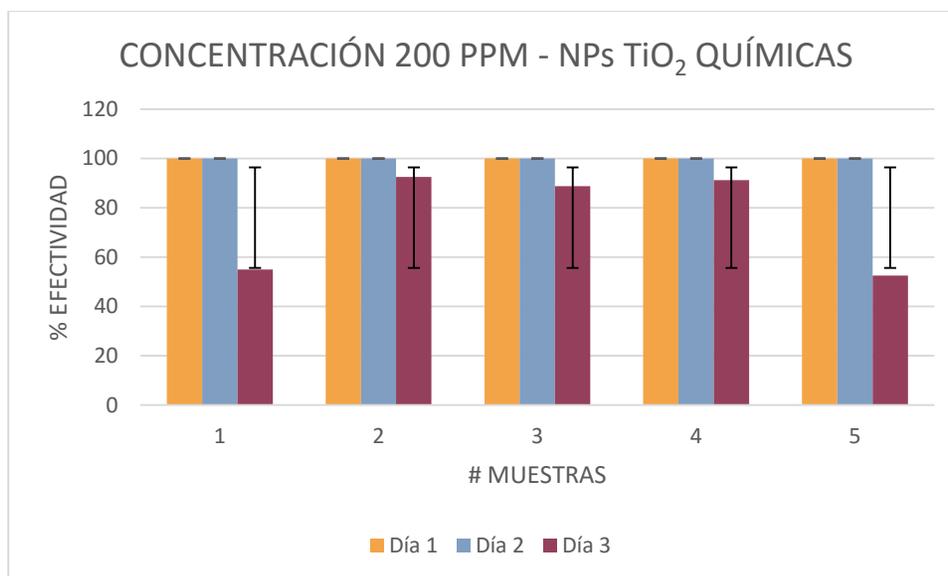


Figura 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solani* en presencia de NPs sintetizadas químicamente a concentración de 200 ppm.

Fuente: Autora

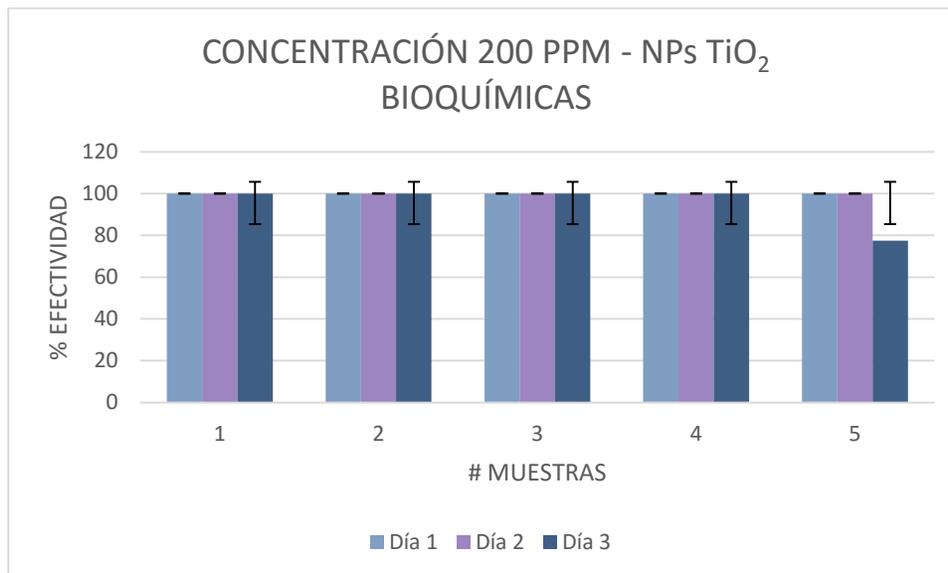


Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solani* en presencia de NPs sintetizadas bioquímicamente a concentración de 200 ppm.

Fuente: Autora

El desarrollo del hongo *Fusarium solan* en presencia de NPs de TiO₂ de 200 ppm presentó un comportamiento semejante a las de 100 ppm. De igual manera se visualizó ausencia del hongo en los dos primeros días, mientras que, en el tercer día las NPs químicas presentes en el medio inhibieron el crecimiento en un 76% en promedio, y las bioquímicas en un 95,5% en promedio. En general se observó mejor desempeño de las nanopartículas sintetizadas bioquímicamente en el proceso.

Así mismo se observó que el hongo desarrolló un mecanismo de defensa encapsulando las nanopartículas buscando de esta manera la interrupción del proceso fotocatalítico que inhibe su crecimiento.

En la figura 17 y 18 se puede analizar el comportamiento de la nanopartículas de TiO₂ químicas y bioquímicas respectivamente, bajo la misma concentración de 400 ppm.

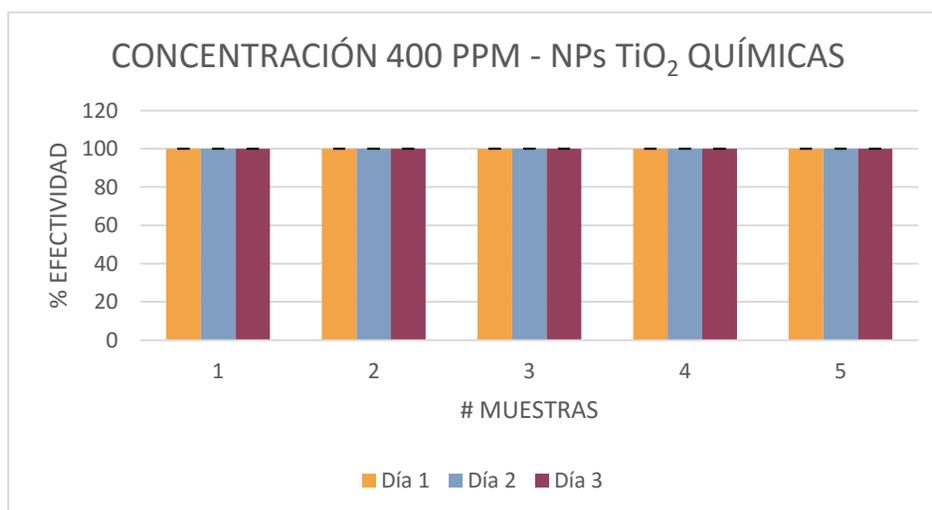


Figura 17. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solan* en presencia de NPs sintetizadas químicamente a concentración de 400 ppm.

Fuente: Autora

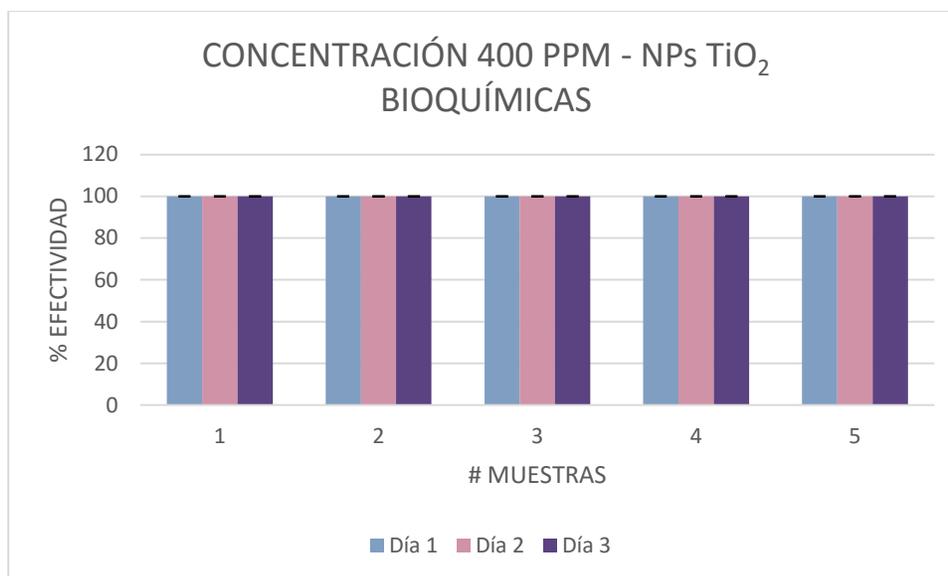


Figura 18. Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium solani* en presencia de NPs sintetizadas bioquímicamente a concentración de 400 ppm.

Fuente: Autora

En la figura 17 y 18 se evidencia una inhibición del crecimiento del hongo de 100% en presencia de ambos tipos de nanopartículas aplicadas.

4.3.1 Análisis estadísticos de ensayos realizados

En la figura 19 y en la tabla 19 se presenta análisis de varianza para la relación de diferentes concentraciones de las nanopartículas aplicadas (100, 200 y 400 ppm) y tiempo de ensayo (1,2 y 3 días), lo cual constituye diseño experimental factorial 3^2 .

La hipótesis interactiva en este diseño, fue que hay un efecto inhibitorio de crecimiento de hongo en presencia de nanopartículas y la hipótesis nula que es la afirmación contraria.

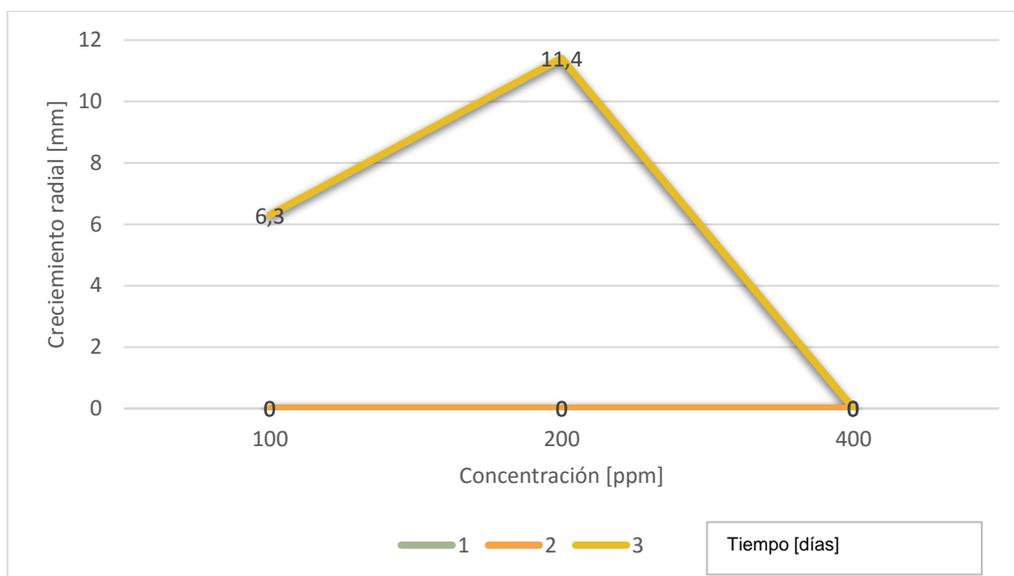


Figura 19. Análisis de varianza de crecimiento de hongo a diferentes concentraciones de NPs químicas y bioquímicas y el tiempo.

Fuente: Autora

De la figura 19 se puede observar la influencia del tiempo y de la concentración de NPs para el crecimiento de hongo de interés. Por otro lado, se puede ver nulo crecimiento del hongo a 100 y 200 ppm de las nanopartículas hasta dos días y para la concentración de 400 ppm en todo el tiempo analizado. Resalta el crecimiento del hongo al tercer día para la concentración de 100 y 200 ppm.

En la tabla 19 se reporta el resumen de análisis de varianza del diseño experimental factorial aplicado.

Tabla 19.

Análisis de Varianza del diseño experimental factorial aplicado para el crecimiento del hongo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra [concentración]	696.2	2	348.1	12.0367556	2.64952E-05	3.109310547
Columnas [tiempo]	217.4	2	108.7	3.758676628	0.027478452	3.109310547
Interacción entre concentración y tiempo	434.8	4	108.7	3.758676628	0.007430615	2.48444144
Dentro del grupo [error]	2342.5	81	28.9197530			9
Total	3690.9	89				

Teniendo en cuenta que el valor de la media cuadrática (F) en el análisis de varianza, puede acertar la hipótesis nula o interactiva, se evaluó este parámetro.

El resultado obtenido de F , supera a $F_{critica}$, lo cual significa que los cambios en las concentraciones de NPs de TiO_2 , sintetizadas química y bioquímicamente, tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la inhibición del crecimiento radial del hongo *Fusarium solaní*. De esta manera la hipótesis nula no es válida, el cambio la hipótesis interactiva sí lo es. Por lo tanto, el incremento de las concentraciones de nanopartículas afecta directamente la tasa de crecimiento radial del hongo. Entre las interacciones se demuestra que las concentraciones iguales o superiores a 400 ppm son más efectivas en cuanto al crecimiento radial del hongo, cual no se desarrolla a estas concentraciones de NPs.

El valor de la probabilidad (P) confirma la significancia de la concentración de NPs, del tiempo y de la interacción de los dos factores.

En la figura 20 se analiza de varianza del porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo a diferentes concentraciones de NPs y tiempo.

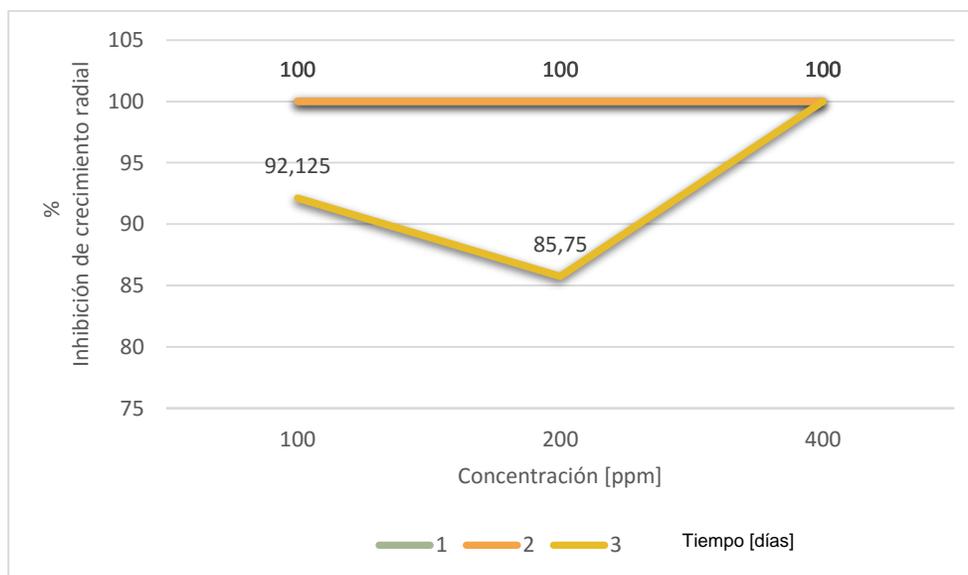


Figura 20. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo a diferentes concentraciones de NPs químicas y bioquímicas y del tiempo.

Fuente: Autora

De la figura 20 se puede observar que el porcentaje de inhibición del crecimiento de hongo logra 100% de efectividad en los dos primeros días en todas las concentraciones. En las concentraciones bajas (100 y 200 ppm) el % de inhibición es 92,125% y 85,75%, respectivamente. Resalta el resultado de la inhibición de crecimiento del hongo en presencia de nanopartículas de TiO_2 a 400 ppm, siendo esta concentración 100% efectiva para la inhibición durante el tiempo analizado.

En la tabla 20 se analiza la varianza del diseño experimental factorial aplicado para la inhibición del crecimiento del hongo.

Tabla 20.

Análisis de Varianza del diseño experimental factorial aplicado para la inhibición del crecimiento del hongo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad [P]</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra [concentración]	1087.8125	2	543.90625	12.0367556	2.64952E-05	3.109310547
Columnas [tiempo]	339.6875	2	169.84375	3.758676628	0.027478452	3.109310547
Interacción entre concentración y tiempo	679.375	4	169.84375	3.758676628	0.007430615	2.48444144
Dentro del grupo	3660.15625	81	45.1871142			
Total	5767.03125	89				

Nuevamente el valor de F elimina la hipótesis nula, y los valores de P indican alta significancia de los dos factores y de la interacción entre ellos.

5. Conclusiones

Las nanopartículas de óxido de titanio, sintetizadas químicamente y bioquímicamente ejercen un efecto inhibitor sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solaní* presente en el cultivo de palma de aceite.

La caracterización observada por SEM de las nanopartículas de TiO₂ sintetizadas químicamente, reveló su aglomeración semiesférica, con tamaño de oscilación de 12.30 nm y un alto grado de aglomeración, mientras que las sintetizadas bioquímicamente presentan forma esferoidal, con tamaño de oscilación de 14.60 nm y menor grado de aglomeración.

El suelo afectado por la enfermedad de pudrición de cogollo presenta la textura arenosa, que se diferencia de la clasificación Franco Arenosa y Arcillo Arenosa de los suelos sanos, creando déficit de humedad y nutrientes, lo cual con el bajo contenido de materia orgánica genera condiciones restrictivas para el cultivo de la palma.

Un efecto 100% inhibitor en el crecimiento del hongo imparten las nanopartículas de óxido de titanio a concentración de 400 ppm durante 3 días analizadas, mientras que las concentraciones bajas (100 ppm y 200 ppm) son 100% efectivas solo por dos primeros días.

Las nanopartículas sintetizadas bioquímicamente presentan mejor efectividad para la inhibición del hongo *Fusarium solaní*, que las sintetizadas químicamente.

Análisis estadístico factorial 3^2 indica alta significancia de los dos factores analizados (concentración y tiempo), y de la interacción que hay entre ellos.

6. Recomendaciones

Se recomienda analizar la influencia del tamaño y el grado de aglomeración de las nanopartículas de TiO_2 sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solan*.

Se sugiere analizar la inhibición de crecimiento de los otros hongos aislados de la palma de aceite bajo la influencia de nanopartículas de óxido titanio.

Se recomienda realizar la identificación de todos los hongos causantes de pudrición de cogollo de palma de aceite en la finca afectada de esta plaga.

Comparar la inhibición de crecimiento del hongo *Fusarium solan* bajo la influencia de diferentes tipos de nanopartículas

Se recomienda analizar la influencia de la nanopartículas de TiO_2 sobre la microbiota del suelo.

Finalmente se cree que este estudio debería ser analizado a nivel de campo con un estudio de perfectibilidad.

Referencias Bibliográficas

- Antibacterianas, S. U. S. P. (2015). Centro de investigación en biotecnología aplicada, 5, 87816.
- Betancur Henao, C. P. (2016). Nanoparticles for antibacterial materials and titanium dioxide applications. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000400009
- Cenipalma, D. (1992). Fusarium sotaní : Agente causal del complejo pudrición del cogollo ?*, (1), 59–67.
- Colorado, U. . (2015). Mineral Structure and property Data-TiO2.
- CORPOICA. (2013). Guía toma de muestras de suelos, 15.
- Fedepalma. (2013). Panorama de la agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en la Zona Norte del País: Situación actual, Retos y Perspectivas., 1–49. Retrieved from <http://web.fedepalma.org/bigdata/zonaprivada/panoramadelaagroindustriadelapalmadeaceiteencolombiayenzonanorte.pdf>
- Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite., E. J. O., & Centro de Investigación en Palma de Aceite. (1995). Características físico-químicas del suelo y su incidencia en la absorción de nutrimentos, con énfasis en el cultivo de la palma de aceite. *Revista Palmas*, 16(1), 31–39. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/461/461>
- Laing, D. (2011). La Deficiencia Transitoria De Calcio Como Causa Primordial De La Pudrición De Cogollo En Palma De Aceite. *Informaciones Agronomicas*, 3, 26–52.
- Leon, P., & Cuervo, G. (1995). Estado actual de la investigación sobre pudrición de cogollo Current status of bud rot research, (1), 9–23.

Luginbuhl, S. (2010). Fusarium Solani. Retrieved from https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Fusarium_solani/Fusarium_solani.htm

Microbiol, R. (2014). Retrato Microbiológico, 31(1), 85–86.

Mónica Andrea Vargas Urbano, Yasser Halil Ochoa Muñoz, Yamileth Ortegón Fernández, Patricia Mosquera, J. E. R. P. (2011). Nanoparticles of TiO₂, anatase phase, synthesized by chemical methods. Retrieved from <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/ingenieria/article/viewArticle/3622/4535>

Mosquera, E., Rosas, N., Debut, A., Guerrero, V. H., & Materiales, L. D. N. (2015). Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Dióxido de Titanio Obtenidas por el Método de Sol-Gel, 36(3).

Saenz, L. (2006). Cultivo de la palma africana guía técnica. *Iica*, 27.

Soil Survey Staff. (2014). Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual. *Soil Survey Investigations*, (Report No. 51, Version 2.0), 487. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3803.8889>

Thompson, M. S., & Wiseman, G. H. (1989). Synthesis and microstructure of gel-derived varistor precursor powders. *Ceramics International*, 15(5), 281–288. [https://doi.org/10.1016/0272-8842\(89\)90030-8](https://doi.org/10.1016/0272-8842(89)90030-8)

Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Www.Mundonano.Unam.Mx*, 5(1), 69–81. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2012.1>