

Aplicación de Nanomateriales en la Agricultura

Jesús Roldán González Martínez¹

jroldan.glezm@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0002-3939-5404>

Universidad de Sonora

Hermosillo - México

Rogelio Gámez Corrales

rogelio.gamez@unison.mx

<https://orcid.org/0000-0002-3597-7781>

Universidad de Sonora

Hermosillo - México

Felipe Barffuson Domínguez

felipe.barffuson@unison.mx

<https://orcid.org/0000-0002-6105-5318>

Universidad de Sonora

Hermosillo - México

RESUMEN

En los últimos años el uso de los nanomateriales en diversas áreas de ciencia e ingeniería va aumentando consideradamente. En la agricultura no es la excepción, debido a la necesidad de buscar nuevas alternativas a los fungicidas tradicionales para el desarrollo de los granos de maíz y otros cereales. En este trabajo se llevó a cabo un estudio de la citotoxicidad de un material compuesto por quitosano-nanotubos de carbono (CNT) aplicados al hongo *Aspergillus parasiticus* como apoyo en la agricultura y conservación de alimentos. Se determinó la citotoxicidad del material compuesto mediante la técnica experimental de microscopía óptica al evaluar el número de esporas germinadas donde se evidenció la inhibición del crecimiento de hifas en el cultivo del hongo *Aspergillus parasiticus*. Se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se encontró que los nanotubos de carbono se encuentran inmersos en la matriz polimérica del quitosano y se observó la presencia de nanoagregados de quitosano de 50 nm de diámetro que se localizan a su vez a modo de recubrimiento sobre la superficie de los CNT. Este trabajo es una evidencia de que el uso de nanomateriales presenta una buena herramienta en el combate de agentes patógenos en la agricultura.

Palabras clave: citotoxicidad; nanotubos de carbono; quitosano; *aspergillus parasiticus*.

¹ Autor principal

Correspondencia: monicatorres2001@gmail.com

Application of Nanomaterials in Agriculture

ABSTRACT

In recent years, the use of nanomaterials in various areas of science and engineering has increased considerably. In agriculture it is not the exception, due to the need to look for new alternatives to traditional fungicides for the development of corn grains and other cereals. In this work, a study of the cytotoxicity of a material composed of chitosan-carbon nanotubes (CNT) applied to the fungus *Aspergillus parasiticus* as support in agriculture and food preservation was carried out. The cytotoxicity of the composite material was determined through the experimental technique of optical microscopy by evaluating the number of germinated spores where the inhibition of hyphal growth in the culture of the *Aspergillus parasiticus* fungus was evidenced. Transmission electron microscopy (TEM) was used, where it was found that the carbon nanotubes are immersed in the chitosan polymer matrix and the presence of chitosan nanoaggregates of 50 nm in diameter was observed, which in turn are located as a coating on the surface of the CNTs. This work is evidence that the use of nanomaterials presents a good tool in the fight against pathogens in agriculture.

Keywords: *citotoxicity; carbon nanotubes; chitosan; aspergillus parasiticus.*

Artículo recibido 10 julio 2023

Aceptado para publicación: 10 agosto 2023

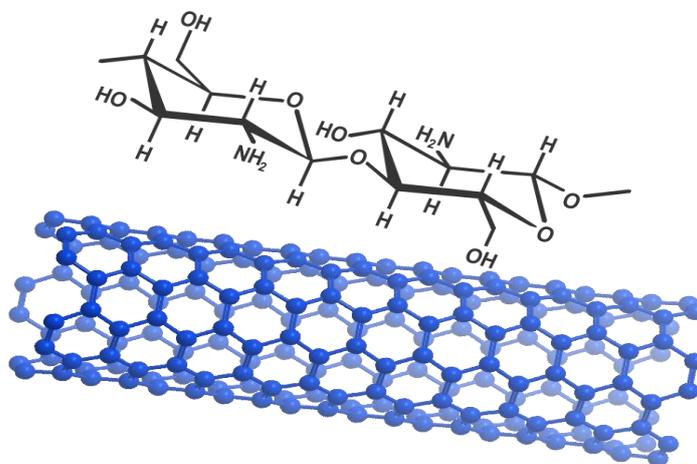
INTRODUCCIÓN

En la actualidad la agricultura enfrenta grandes retos en el uso de herbicidas, fungicidas, bactericidas que deben tener el menor impacto al ser humano y ecológico, reducir las mermas generadas debido a las diferentes plagas de hongos que afectan los cultivos. Además, se busca reducir el gran impacto económico en la agricultura que representa alrededor del 40 por ciento del total de los cultivos. Las plagas no solo afectan la producción agrícola, sino que afectan también la calidad del cultivo.

El género *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como un microorganismo saprofito que puede encontrarse en frutas, verduras u otros sustratos ricos en fuentes de carbono. Algunas especies están significativamente involucradas en el deterioro de los alimentos, como es el caso del *Aspergillus parasiticus*, que producen metabolitos secundarios o micotoxinas que son agentes tóxicos y cancerígenos que causan algunas enfermedades en animales y humanos (Makhuvele et al., 2020).

Históricamente los tratamientos para combatir las plagas en los cultivos son altamente contaminantes, por lo cual existe un gran interés por estudiar y desarrollar materiales que presenten propiedades fungicidas y sean amigables con el medio ambiente. Los aceites esenciales de canela, pimienta, *Schinus molle* (pirul), encapsulada demostraron tener un alto nivel en la inhibición de crecimiento de hongo *Aspergillus parasiticus* y Níger (López-Meneses et al., 2018). Las nanopartículas de óxido de cobre (Soleimani et al., 2022), y las de óxido de zinc son empleadas en el combate de hongos y como ciertos patógenos, respectivamente.

Figura 1. Nanotubo de carbono y monómero de quitosano



En la Figura 1 se muestra la representación esquemática de un nanotubo de carbono y un monómero de quitosano.

Debido a que es un material inocuo para el ser humano (Barrera-Ruiz et al., 2020; Pandey et al., 2020) el quitosano ha sido empleado en el combate de hongos y bacterias (Badawy et al., 2021). El quitosano es un polímero catiónico natural, biodegradable, no tóxico y con un gran número de aplicaciones en biotecnología (Kritchenkov et al., 2020) (ver Figura 1). Es un material con gran potencial en aplicaciones biológicas como son aplicaciones antimicrobianas, transportador de fármacos, trata de aguas residuales entre otras (Mathew et al., 2021). Sin embargo, presenta menor toxicidad que los fungicidas tradicionales. Por lo cual se estudian diferentes métodos para mejorar las propiedades antimicrobianas del quitosano.

En los métodos experimentales para la obtención de nanopartículas de quitosano, la importancia reside en el control del tamaño y forma, e incorporar nuevos materiales a su interior (Sathiyabama & Muthukumar, 2020; Sotelo-Boyás et al., 2015), ya que la superficie de contacto aumenta cuando el tamaño de partícula es menor, por lo tanto, existe una mayor interacción electrostática entre el quitosano y la membrana plasmática del hongo (Castelo Branco Melo et al., 2018). Otra alternativa es hacer uso de otros materiales para crear materiales compuestos. Diversos estudios demostraron que las propiedades del quitosano y nanopartículas de quitosano mejoran sus propiedades catiónicas con la presencia de iones metálicos como el cobre, provocando una mayor interacción electrostática nanopartícula/membrana, induciendo cambios morfológicos severos, provocando agujeros en la membrana y muerte celular (Contreras-Cortés et al., 2019). Los nanotubos de carbono (CNT) han mostrado aplicaciones prometedoras debido a sus propiedades excepcionales en comparación con varios nanomateriales.

Los nanotubos de carbono (CNT) son estructuras cilíndricas formados por hexágonos, en cada vértice se encuentra posicionado un átomo de carbono, la longitud de los nanotubos se extiende hasta los milímetros y su radio puede ser menor a 10 nm, y se distinguen por sus propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas (Patel et al., 2014) (ver Figura 1). Los CNT pueden ser nanotubos de carbono de pared simple, doble pared o multipared. Además de eso, estudios muestran que los CNT son excelentes agentes antimicrobianos (Teixeira-Santos et al., 2021). La eficiencia de los CNT en la eliminación microbiana se ve afectada por varias condiciones, como la temperatura, el pH, el tiempo de retención, la composición del soluto y del solvente (Patil et al., 2021). Sin embargo, los CNT presentan un alto grado

de toxicidad para el ser humano (Zhao et al., 2019), por lo cual se deben de utilizar materiales para recubrirlos si se desea utilizar en el área biológica (Jiang et al., 2014). Por lo mencionado, en este trabajo se estudiará un material compuesto por quitosano y nanotubos de carbono multipared, para potencializar las propiedades fungicidas de ambos materiales.

METODOLOGÍA

Preparaciones de muestras

Para las muestras, se emplean tres pesos moleculares de quitosano (bajo de 70-190 kDa, medio de 190-310 kDa y alto de 310-390 kDa) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT). Los reactivos químicos de quitosano y MWCNT se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron sin purificaciones previas. Mientras que el disolvente utilizado fue una mezcla de agua ultra purificada (con al menos una conductividad eléctrica de 18,2 MΩ/cm) y ácido acético glacial de J. T. Baker con peso molecular de 60.05 g/mol.

Se preparó una disolución acida al 2% utilizando ácido acético donde se agregó quitosano a la disolución acida 2% (p/v). Estas muestras se colocaron por dos horas en un agitador magnético a 130 RPM para después colocarlas una hora en el sonicador para homogeneizarlas. Después de que la solución de quitosano fue homogeneizada se agregaron los nanotubos de carbono multipared con una relación de peso de 5:1 (quitosano-nanotubo de carbono) y se repitió el proceso de homogeneización.

Preparación del inóculo *Aspergillus parasiticus*

En la preparación en inóculo se utilizó la cepa *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992), seleccionada en función de su importancia en la alimentación por ser una especie productora de toxinas. La cepa se activó en agar papa dextrosa (PDA, Bioxon, EE. UU.) acidificada con ácido tartárico (10% p/v) y se incubó durante 5 días a 25 ± 2 °C. Las esporas desarrolladas se resuspendieron agregando medio de cultivo líquido Czapek estéril, agitando con una barra magnética estéril durante 1 min. La concentración de la suspensión de esporas se determinó por recuento en una cámara de Neubauer (Brand, Alemania) y el inóculo se ajustó a una concentración de 1.0×10^5 esporas/ml.

Para determinar los efectos de la mezcla de quitosano y nanotubos de carbono multipared en la germinación de las esporas, se utilizó una microplaca de 12 pozos. En cada pocillo se colocó una muestra de 500 µl de caldo Czapek y luego 6 diferentes tratamientos, 3 de quitosano con diferentes pesos

moleculares y 3 de nanotubos de carbono con los diferentes quitosanos con un volumen final de 500 μ l para ser analizada con agua esterilizada. Los portaobjetos de microscopio se colocaron en el fondo de cada pocillo y se inocularon con aproximadamente 10 x 5 esporas ml⁻¹ y se incubaron a 28 \pm 2 ° C. a las 24 h se determinó el número de esporas germinadas contando 100 esporas (germinadas y no germinadas) utilizando un microscopio óptico.

Determinación morfológica

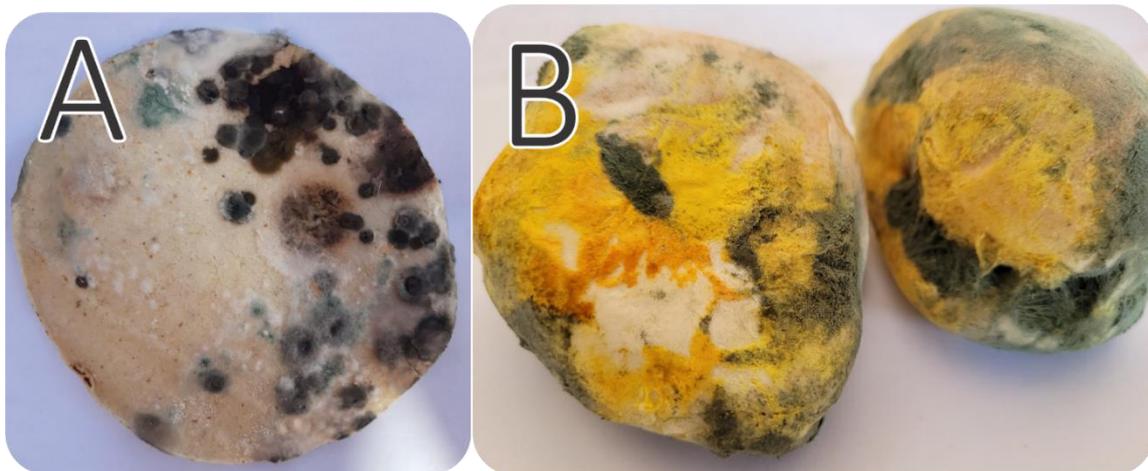
El conteo de esporas germinadas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Olympus CX31, Japón) conectado a una cámara Infinity 1 (Media Cybernetics, EE. UU.) utilizando un objetivo de 40x. Se hizo el conteo de 100 esporas por duplicado por cada tratamiento.

Las micrografías TEM se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL JEM2010F.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 2

Tortilla de maíz y panes de harina de trigo con hongos

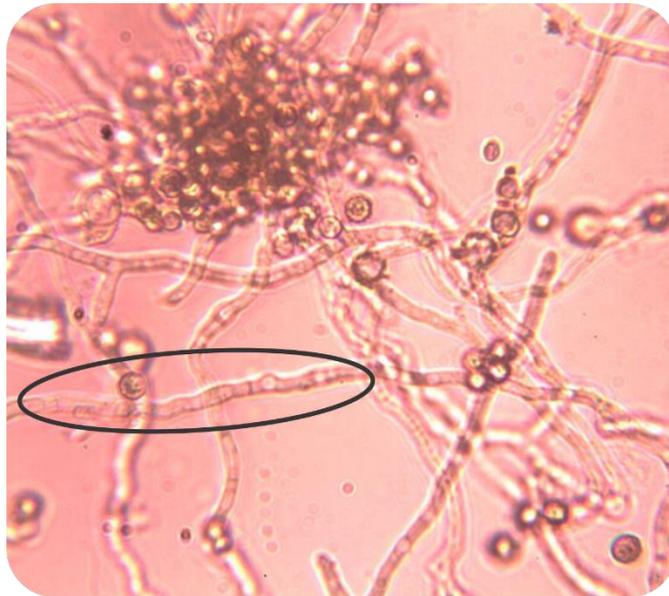


En la Figura 2 se presenta la aparición de hongos en las superficies expuestas en una tortilla de maíz (A) y en panes de harina de trigo (B).

El maíz y el trigo representan la base de la alimentación de la población mexicana (en la presentación de tortilla y pan). Uno de los problemas que presentan estos alimentos es referente al proceso de conservación, tanto del grano como del producto final (tortilla, pan, etc.) es la aparición de microorganismos (bacterias, hongos) (Jin et al., 2022; Souza, 2022). Los hongos son visibles a simple

vista debido a la aparición de hifas que presentan. Algunos de los hongos que se presentan en los alimentos como tortillas de maíz, trigo o pan de trigo pueden ser perjudiciales al ser humano. Los hongos más dañinos son del género *Aspergillus*, que producen aflatoxinas que poseen propiedades inmunosupresoras y están clasificadas como los cancerígenos naturales más potentes que se conocen, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC).

Figura 3. *Microscopia óptica a 40x de esporas Aspergillus parasiticus en medio Czapek líquido, en solvente acuoso.*



En la Figura 3 se observan los nanotubos de carbono multipared recubiertos de nanoagregados de quitosano (indicado en la figura).

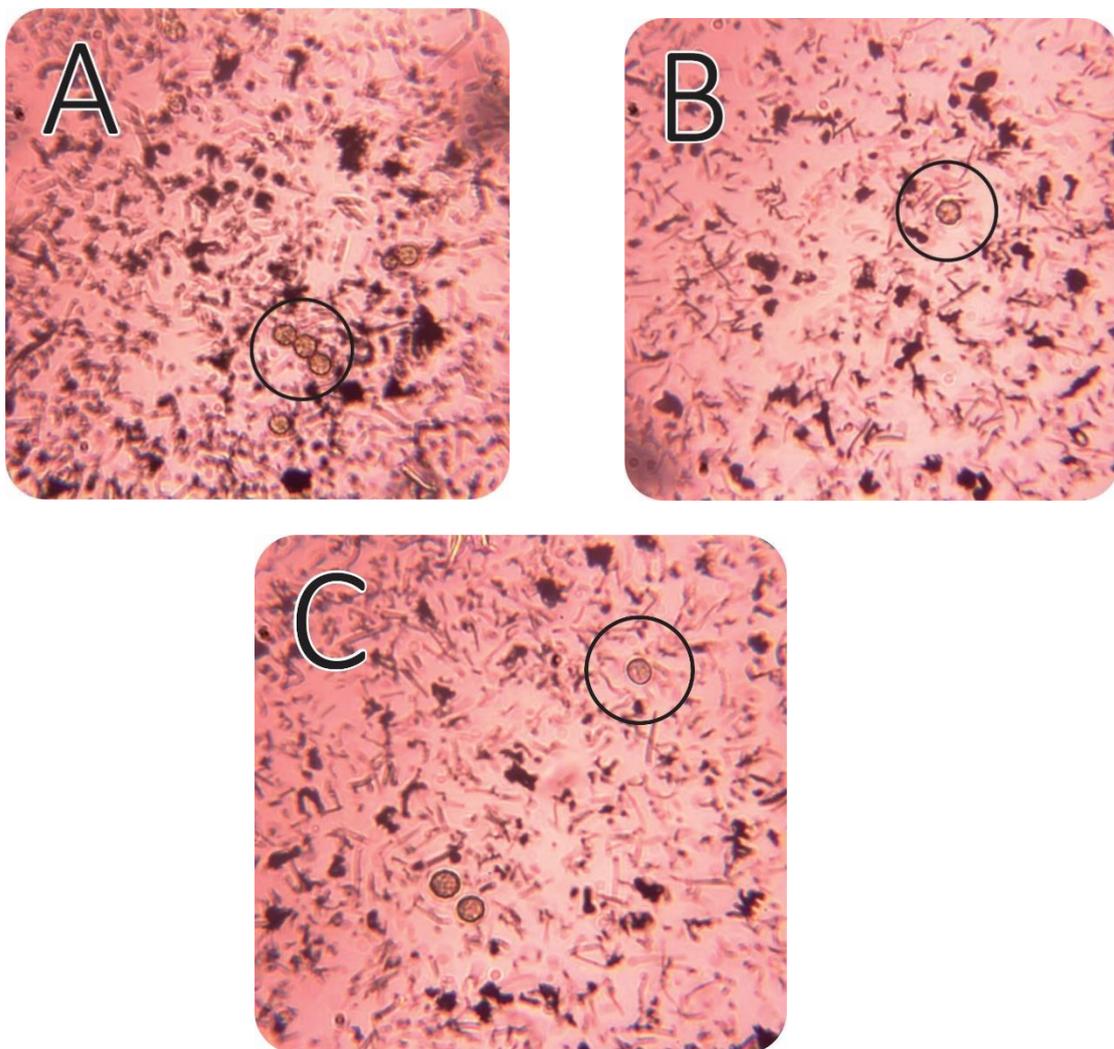
Germinación de esporas

La germinación de esporas es un indicativo de la adaptación fúngica a la presencia de factores externos adversos (ver Figura 3). La inhibición del crecimiento de hifas en el hongo (ver Figura 3) es atribuido a las inadecuadas condiciones para su pleno desarrollo (temperatura, pH, humedad). El quitosano, en medio ácido se protoniza, y al interactuar con los fosfolípidos en la membrana celular lleva a cabo una redistribución de la carga superficial de la membrana (Wang et al., 2017). El desequilibrio electrostático de la membrana celular trae por consecuencias el impedimento de alimentación adecuada del hongo en su entorno.

En este trabajo se observó un crecimiento, en la etapa de germinación, de esporas de *Aspergillus parasiticus* hasta 24 h después de la inoculación en el medio control (MC) (Figura 4). La presencia del material compuesto evito el proceso de germinación con respecto al control. También se observó que el efecto sobre la germinación no dependía del peso molecular utilizado en los tratamientos. La actividad inhibidora del material fue altamente efectiva para evitar la germinación del hongo.

Figura 4

Imágenes de microscopía óptica a 40x de esporas *Aspergillus parasiticus* crecidas en medio Czapek líquido, quitosano-CNT, quitosano-, a 24 horas después de inoculación.

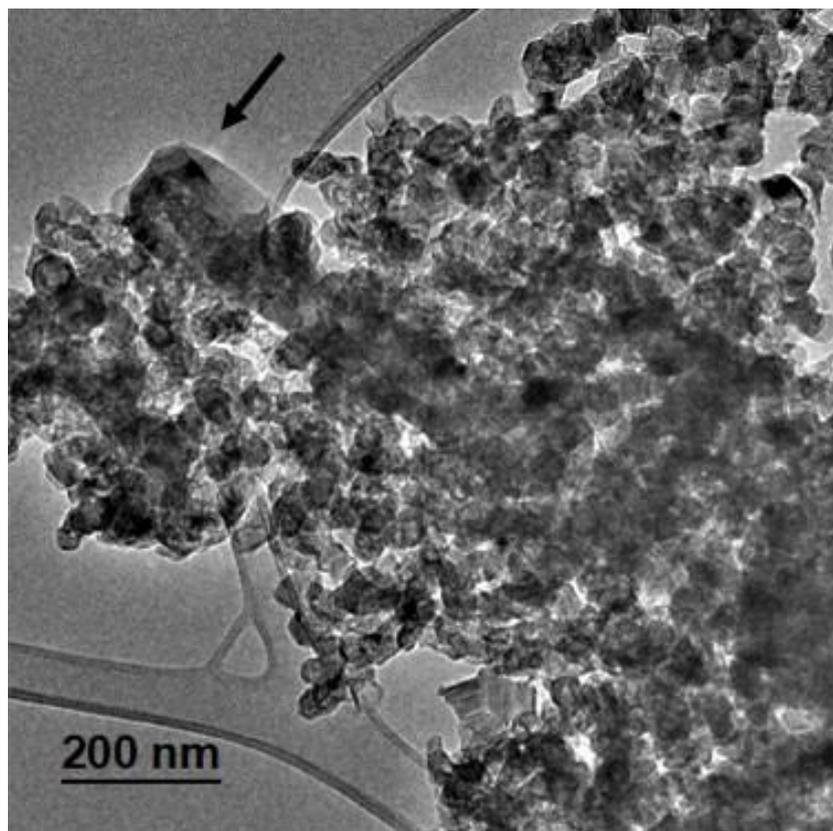


En la Figuras 4A, 4B y 4C, se observa una disminución en el efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas al agregarle la mezcla de quitosano-CNT respecto a las muestras de *Aspergillus parasiticus* (Figura 1).

Al igual que en el crecimiento radial, el tamaño del compuesto de quitosano-CNT afectó la germinación de las esporas de *Aspergillus parasiticus*. En nuestra opinión, este efecto puede ser atribuido a una diferente redistribución de carga sobre los materiales grafitosos, lo que ocasionaría la aparición de dipolos temporales inducidos sobre la superficie exterior de los CNT. La carga en el material es un factor muy importante que debe de tomarse en cuenta debido a que su interacción con los componentes negativos presentes en la pared celular de la espora del hongo. Los cambios morfológicos encontrados en las esporas fueron más notables y evidentes en los medios que contenían el compuesto quitosano-CNT. La superficie de contacto aumenta cuando el tamaño de partícula es menor, por lo tanto, existe una mayor interacción electrostática entre el quitosano y la membrana plasmática del hongo.

Figura 5

Microscopia Electrónica de Transmisión



En la Figura 5 se presenta una imagen de microscopia electrónica de transmisión (TEM) de CNT recubiertas por quitosano. La presencia de agregados esféricos de 50 nm de diámetro compuestas de quitosano sobre la superficie del CNT se puede observar (ver Figura 5). En la imagen se observan agregados esféricos de quitosano interactuando con el CNT, los cuales se aglomeran para formar

estructuras jerárquicas filiformes con tamaños superiores a un micrómetro. La interacción de CNT y los agregados esféricos de quitosano se llevan a cabo mediante interacciones del tipo Van der Waals. La interacción se da entre el anillo bencénico del CNT y los grupos OH presentes en el monómero del quitosano.

CONCLUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo un estudio de materiales compuesto de quitosano-CNT para la erradicación del hongo *Aspergillus parasiticus*, como apoyo en la agricultura y conservación de alimentos. Mediante la técnica experimental de microscopia óptica se evidenciaron la inhibición del crecimiento de hifas en el cultivo del hongo *Aspergillus parasiticus*, el cual afecta el desarrollo de los granos de maíz y otros cereales. En la mezcla de quitosano-CNT se observó mediante TEM la presencia de nanoagregados de quitosano de 50 nm de diámetro que se localizan a su vez a modo de recubrimiento sobre la superficie de los CNT. La interacción de Van der Waals de CNT y agregado de quitosano presentan un dipolo temporal (o dipolo de Keesom) que llevan a cabo un desequilibrio electrostático de la superficie de la membrana celular del hongo, lo que impide también el crecimiento de las hifas. En este trabajo se evidencia que el uso de nanomateriales presenta una buena herramienta en el combate de agentes patógenos en la agricultura.

LISTA DE REFERENCIAS

- Badawy, M. E. I., Rabea, E. I., Eid, A. R., Badr, M. M., & Marei, G. I. K. (2021). Structure and antimicrobial comparison between N-(benzyl) chitosan derivatives and N-(benzyl) chitosan tripolyphosphate nanoparticles against bacteria, fungi, and yeast. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 724–734. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.086>
- Barrera-Ruiz, D. G., Cuestas-Rosas, G. C., Sánchez-Mariñez, R. I., Álvarez-Ainza, M. L., Moreno-Ibarra, G. M., López-Meneses, A. K., Plascencia-Jatomea, M., & Cortez-Rocha, M. O. (2020). Antibacterial activity of essential oils encapsulated in chitosan nanoparticles. *Food Science and Technology (Brazil)*, 40, 568–573. <https://doi.org/10.1590/fst.34519>
- Castelo Branco Melo, N. F., de MendonçaSoares, B. L., Marques Diniz, K., Ferreira Leal, C., Canto, D., Flores, M. A. P., Henrique da Costa Tavares-Filho, J., Galembeck, A., Montenegro Stamford, T. L., Montenegro Stamford-Arnaud, T., & Montenegro Stamford, T. C. (2018). Effects of fungal

chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.014>

Contreras-Cortés, A. G., Almendariz-Tapia, F. J., Gómez-Álvarez, A., Burgos-Hernández, A., Luque-Alcaraz, A. G., Rodríguez-Félix, F., Quevedo-López, M. Á., & Plascencia-Jatomea, M. (2019). Toxicological assessment of cross-linked beads of chitosan-alginate and *Aspergillus australensis* biomass, with efficiency as biosorbent for copper removal. *Polymers*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/polym11020222>

Jiang, Q., Wang, X., Zhu, Y., Hui, D., & Qiu, Y. (2014). Mechanical, electrical and thermal properties of aligned carbon nanotube/polyimide composites. *Composites Part B: Engineering*, 56, 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2013.08.064>

Jin, S., Wang, Y., & Zhao, X. (2022). Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 169). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105652>

Kritchenkov, A. S., Zhaliashniak, N. V., Egorov, A. R., Lobanov, N. N., Volkova, O. V., Zabodalova, L. A., Suchkova, E. P., Kurliuk, A. V., Shakola, T. V., Rubanik, V. V., Yagafarov, N. Z., Khomik, A. S., & Khrus, V. N. (2020). Chitosan derivatives and their based nanoparticles: ultrasonic approach to the synthesis, antimicrobial and transfection properties. *Carbohydrate Polymers*, 242, 116478. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116478>

López-Meneses, A. K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Rodríguez-Félix, F., Mouriño-Pérez, R. R., & Cortez-Rocha, M. O. (2018). Schinus molle L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *Lwt*, 96, 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.013>

Makhuvele, R., Naidu, K., Gbashi, S., Thipe, V. C., Adebo, O. A., & Njobeh, P. B. (2020). The use of plant extracts and their phytochemicals for control of toxigenic fungi and mycotoxins. *Heliyon*, 6, e05291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05291>

Mathew, R., Hegde, S., Mathew, S., Shruthi, N., & Geevarghese, S. (2021). Antimicrobial activity of a remineralizing paste containing Strontium doped Nano hydroxyapatite (Sr-nHAp) with Non Collagenous Protein (NCP) analogue Chitosan – An in vitro study. In *Materials Today:*

Proceedings. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.402>

- Pandey, V. K., Upadhyay, S. N., Niranjana, K., & Mishra, P. K. (2020). Antimicrobial biodegradable chitosan-based composite Nano-layers for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, *157*, 212–219.
- Patel, D., Maeda, M., Choi, S., Jum Kim, S., Mohammed, S., Meethale Parakandy, J., Al Hossain, M. S., & Ho Kim, J. (2014). Multiwalled carbon nanotube-derived superior electrical, mechanical and thermal properties in MgB₂ wires Elsevier Enhanced Reader. *Scripta Materialia*, *88*, 13–16. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.scriptamat.2014.06.010>
- Patil, T. V., Patel, D. K., Dutta, S. D., Ganguly, K., Randhawa, A., & Lim, K. T. (2021). Carbon nanotubes-based hydrogels for bacterial eradication and wound-healing applications. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(20). <https://doi.org/10.3390/app11209550>
- Sathiyabama, M., & Muthukumar, S. (2020). Chitosan guar nanoparticle preparation and its in vitro antimicrobial activity towards phytopathogens of rice. *International Journal of Biological Macromolecules*, *153*, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.001>
- Soleimani, P., Mehrvar, A., Michaud, J. P., & Vaez, N. (2022). Optimization of silver nanoparticle biosynthesis by entomopathogenic fungi and assays of their antimicrobial and antifungal properties. In *Journal of Invertebrate Pathology* (Vol. 190). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107749>
- Sotelo-Boyás, M. E., Valverde-Aguilar, G., Plascencia-Jatomea, M., Correa-Pacheco, Z. N., Jiménez-Aparicio, A., Solorza-Feria, J., Barrera-Necha, L., & Bautista-Baños, S. (2015). Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. In vitro effect on *Pectobacterium carotovorum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *14*(3), 589–599. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62043088003.pdf>
- Souza, P. F. (2022). Synthetic antimicrobial peptides for controlling fungi in foods. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100819>
- Teixeira-Santos, R., Gomes, M., Gomes, L. C., & Mergulhão, F. J. (2021). Antimicrobial and anti-adhesive properties of carbon nanotube-based surfaces for medical applications: a systematic review. In *iScience* (Vol. 24, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.102001>

- Wang, Y., Li, B., Zhang, X., Peng, N., Mei, Y., & Liang, Y. (2017). Low molecular weight chitosan is an effective antifungal agent against *Botryosphaeria* sp. and preservative agent for pear (*Pyrus*) fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 1135–1143. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.105>
- Zhao, X., Chang, S., Long, J., Li, J., Li, X., & Cao, Y. (2019). The toxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human endothelial cells: The influence of diameters of MWCNTs. *Food and Chemical Toxicology*, 126, 169–177. <https://doi.org/hppts://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.026>