

Nanomaterial híbrido como bio-fungicida para el sector agrícola

Hybrid nanomaterial as a bio-fungicide for the agricultural sector

Diego Vaca Toledo,*¹ Alejandra Santana Cruz,** Roberto Guerra Gonzales,*
Jorge Luis Flores Moreno, ** Jesús Salvador López Bucio,*
Homero Reyes de la Cruz,* Saúl Vázquez Fuentes*

ABSTRACT: In this work, a nanomaterial was developed based on a structure of double laminar hydroxide *DLH* (*ZnAl*) impregnated with organic molecules of thymol; the fungistatic effect was studied *in vitro* and *in vivo* against two phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* causing diseases in orchards such as anthracnose and gray mold. The synthesis of this nanomaterial was carried out by the method of reconstruction of the mixed oxide *ZnAl*-(O) through a combustion; the physicochemical characterization of the material was carried out by X-ray diffraction XRD, thermogravimetric analysis TGA, infrared spectroscopy by Fourier transforms FTIR and scanning electron microscopy SEM. A conservation analysis of the organic molecule thymol was carried out in the presence of the phytopathogenic fungus *B. cinerea* and without the biochemical action of this, by means of high efficacy liquid chromatography HPLC. Concluding that the hybrid nanomaterial synthesized *DLH-T* can be a great alternative to mitigate agricultural problems derived from phytopathogenic fungi without damaging the environment and avoiding sanitary problems; this by the protection that *DLH* provides to thymol thus delaying its decomposition and making it much more manageable.

KEYWORDS: double hydroxide layer, phytopathogenic, fungistatic, hybrid.

RESUMEN: En este trabajo se desarrolló un nanomaterial a base de una estructura de hidróxido doble laminar *HDL* (*ZnAl*) impregnado de moléculas orgánicas de timol; se estudió el efecto fungistático *in vitro* e *in vivo* ante dos hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* causantes de enfermedades en plantas como la antracnosis y el moho gris. La síntesis de este nanomaterial se llevó a cabo por el método de reconstrucción del óxido mixto *ZnAl*-(O) pasando por una combustión; la caracterización fisicoquímica del material se efectuó por difracción de rayos-X XRD, análisis termogravimétrico TGA, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier FTIR y microscopía electrónica de barrido MEB. Se realizó un análisis de conservación de la molécula orgánica timol en presencia del hongo fitopatógeno *B. cinerea* y sin la acción bioquímica de este, mediante cromatografía líquida de alta eficacia HPLC. Concluyendo que el nanomaterial híbrido sintetizado *HDL-T* puede ser una alternativa para mitigar problemas agrícolas derivado de hongos fitopatógenos sin dañar el medio ambiente y evitando problemas sanitarios; esto por la protección que el *HDL* le brinda al timol retardando así su descomposición y haciéndole mucho más manejable.

PALABRAS CLAVE: fitopatógeno, fungistático, híbrido, hidróxido doble laminar.

Recibido: 8 de marzo, 2022. Aceptado: 6 de junio, 2022. Publicado: 21 de septiembre, 2022.

* Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciencias Básicas de Ingeniería Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Laboratorio de Biotecnología de Plantas.

** Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Área de Química de Materiales.

† Autor de correspondencia: diego.vaca@umich.mx

Introducción

El sector agrícola es la fuente principal para la alimentación humana, no obstante, a lo largo de la historia las sociedades han enfrentado retos relacionados con enfermedades de los cultivos o siniestros como exceso de lluvias, adicionando ahora el calentamiento global que ha generado un desequilibrio ecológico; contaminación por uso de agroquímicos que ocasionan daños sanitarios, por lo que es necesaria una transición a la producción agrícola sustentable, inocua y de calidad. Dentro de todas las anomalías que enfrentan día a día en el sector agrícola se encuentran las enfermedades derivadas por hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* que se conocen como antracnosis y moho gris causantes de pudrición del fruto (Lemus-Soriano y Pérez-Aguilar, 2017; Dean, *et al.*, 2012; Juárez-Becerra *et al.*, 2010), siendo estas dos especies de las más involucradas en problemas agrícolas conllevando a pérdidas económicas, contaminación y problemas sanitarios (Huerta, G. *et al.*, 2009). Estas enfermedades son muy comunes en frutos tales como mango (*Mangifera indica*), aguacate (*Persea americana*) y fresas (*Fragaria spp*), donde su desarrollo depende mucho de climas húmedos y calurosos. Los productores tienden a mitigar estas enfermedades con fungicidas organosintéticos como sulfonamidas, benzimidazoles, tiofanatos, fenólicos, entre otros (FAO 2010), que son dañinos para la salud, flora, fauna además de contaminar mantos acuíferos, desencadenando desequilibrios tróficos (Barcenas, 2005; Benítez-Leite *et al.*, 2010; Simoniel, M. F. *et al.*, 2010; Jáquez Matas *et al.*, 2008). Existen alternativas naturales para combatir este tipo de problemas, sin embargo, hace falta mejorar los mecanismos o las tecnologías para su aplicación *in situ*; como ejemplo de estas sustancias de origen natural tenemos los extractos esenciales como los de tomillo (*Thymus*), lavanda (*Lavandula*), eucalipto (*Eucalyptus*). Los extractos esenciales provienen de los ciclos metabólicos de las plantas y les brindan de manera natural propiedades de defensa ante insectos, hongos, virus y bacterias; al igual que propiedades sensoriales y de aroma (Montoya, 2010). Estos aceites también presentan propiedades antisépticas y son utilizados tanto en la vida cotidiana como en diferentes sectores de la industria: farmacéutica, ganadera, alimentaria, cosmética y fitosanitaria (Camacho 2007). Su principal composición son los grupos fenólicos; sin embargo, no se ha identificado con claridad el mecanismo de reacción que estos tienen para atacar bacterias u hongos, pero pueden alterar su membrana celular o dañar su material genético. De manera general se sabe que el efecto de los aceites esenciales se puede llevar en: la pared celular, la membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética o síntesis de esta (Palou-García y García-García, 2008; Lambert *et al.*, 2001).

Uno de los principios activos con mayor efecto fungicida es el timol presente en el tomillo principalmente, y que es hasta cinco veces más tóxico para bacterias y hongos en comparación con el fenol (Palou-García y García-García, 2008). El timol es una molécula orgánica con potencial efecto para el

manejo de hongos fitopatógenos. No obstante, sus características fisicoquímicas limitan su uso: es muy volátil, poco soluble en agua y tiene un aroma característico que lo hace de difícil tolerancia y complicado manejo (Lemus-Soriano y Pérez-Aguilar, 2017; Bruneton, 2001). Ciertos estudios han mostrado que el timol presenta un amplio efecto bactericida y fungicida en el rango de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Dias de Castro *et al.*, 2015; Numpaque *et al.*, 2011). Se le atribuyen “efectos membrana-tróficos”, perfora la membrana citoplasmática e induce a la fuga de material intracelular, fuga excesiva de iones potasio en primera instancia. Estos efectos sobre la potencial transmembrana desencadenan inhibición de los generadores de ATP (Kang y Sun, 2014; Shapiro y Guggenheim, 1995). Por otro lado, el timol sufre una biotransformación a iones y compuestos secundarios (Berrocal, 2014; Lambert *et al.*, 2001), esta biotransformación del timol en compuestos secundarios debido a la acción bioquímica de hongos y bacterias, lo hace no perjudicial ante hongos benéficos fundamentales en el proceso trófico, comparándolo con fungicidas tradicionales que no son bio-transformados tan fácilmente y perduran en el ambiente mucho tiempo contaminando y dañando el ecosistema (Barcenas, 2005).

El desarrollo de nanomateriales amigables con el medio ambiente y de bajo costo económico es un tema amplio para los investigadores que se dedican a dicha área, hay una amplia gama para elegir y contribuir al desarrollo de algún nanomaterial que brinde nobles beneficios al sector social y ambiental. En el sector agrícola el desarrollo de agroquímicos que sean amigables con el ambiente no solo está siendo impulsado por la ciencia y la industria, sino también a través de políticas gubernamentales que vienen avanzando a nivel internacional (Sabourin *et al.*, 2017). Además, existen tecnologías basadas en los nanomateriales como los hidróxidos dobles laminares (HDL), su estudio en la ciencia e industria relacionada con la genética, la medicina, el medio ambiente, los catalizadores, los adsorbentes, como aditivos en polímeros, entre otras. Estos materiales están teniendo aceptación debido a sus características favorables para su manejo y desarrollo de compuestos híbridos con acción bioquímica, al intercalar una molécula biológicamente activa (Martínez y Carbajal, 2012; Béjar, 2016; Feng y Dua, 1998). Estos HDL son matrices inorgánicas con una estructura general; $[M^{II}]_{1-x}M^{III}_x(OH)_2(A^{n-})_{n/x}] \cdot H_2O$ (Miyata 1975) donde M^{II} y M^{III} son cationes divalentes y trivalentes, respectivamente, A^{n-} es el anión que reside en la región interlaminar, los aniones situados en la región interlaminar son móviles y pueden intercambiarse por moléculas de naturaleza distinta algo así como ósmosis sintética, de tal manera que se aprovecha esta característica para introducir aniones orgánicos, inorgánicos o biomoléculas, tienen la capacidad de albergar en su región interlaminar moléculas orgánicas que a su vez les brindan protección y mejoran sus características. Estos HDL, además de tener una gran estabilidad ante la temperatura, tienen la capacidad de reconstruirse después de haber sufrido desnaturalización o rompimiento de su estructura laminar, lo cual se conoce como

efecto memoria e, incluso, tienen una característica de intercambio iónico que les da la posibilidad de desplazar moléculas en su región interlaminar por moléculas más afines (Béjar 2016). Los *HDL* han ido adquiriendo mayor impacto en la industria y en la investigación en los últimos años debido a su fácil y económica síntesis además de su gran beneficio en diversos sectores (Béjar, 2016; Damián, 2017; Bernardo *et al.*, 2018). Hay diversos métodos para la síntesis de los *HDL* y todos brindan distintas características en los nanomateriales dependiendo del enfoque que se les dé en la investigación o industria; por ejemplo, han utilizado el método sol-gel con irradiación de microondas para obtener un *HDL* capaz de remover cromo y remediar suelos, y también con el objetivo de buscar una constitución de partículas pequeñas (Ramos *et al.*, 1997; Benito *et al.*, 2009), otro método es el de irradiación de microondas, buscando un tamaño menor en cristales y acotar el tiempo de cristalización (Fetter *et al.*, 1997), también está el método por hidrólisis de urea que busca alta cristalización y buena propiedad de efecto memoria (Costantino *et al.*, 1998), y el método de emulsión en solución con variaciones de pH donde se busca un área superficial amplia (Jing He *et al.*, 2004), sin embargo; los métodos más empleados son los basados en la precipitación de sales, tales métodos son el de coprecipitación a baja y alta sobresaturación, más económicos y prácticos que los anteriores.

Para los fines de este trabajo se optó por el método de combustión, más reciente en la investigación, y que deriva de una solución con un compuesto que ejerza combustión al aplicar temperatura, buscando obtener óxidos mixtos facilitando su homogeneización y una directa síntesis de los nano híbridos (Kashinath *et al.*, 2002), este método puede ayudar en la eficacia de la intercalación o impregnación de los aniones o moléculas deseadas, pues al descomponer un *HDL* a óxidos mixtos todos sus aniones serán eliminados quedando libre la entrada en su reconstrucción para intercalar o absorber una nueva molécula sin necesidad de competir contra otros aniones. Aunque este método o ruta de solución en combustión es dirigido para la formación de *ZnO* y *AlO* para distintas aplicaciones de remediación o como semiconductores, por mencionar algunos (Rajeshwa y de Tacconi, 2009). Este método se dirigió hacia los *HDL* con *Zn* y *Al* en su estructura.

El método de combustión se basa en la propiedad de efecto memoria, o reconstrucción de la estructura de un *HDL*, este fenómeno se aprovecha para formar un nano híbrido con un anión orgánico deseable en su región interlaminar. Está basado en un proceso de desnaturalización/reconstrucción de la estructura laminar del *HDL* provocado por un tratamiento térmico generando sus óxidos mixtos de los metales puestos en tratamiento. Posteriormente, al poner estos óxidos mixtos en contacto con una solución alcalina que contenga aniones de interés, este recobrará su estructura laminar original y en la región interlaminar residirán los aniones contenidos en la solución o, en efecto, los aniones o moléculas se impregnarán sobre el área superficial a los 600 °C, que es la temperatura a la cual se observa el fenómeno de descomposición y formación de los óxidos mixtos; estos se llevan a una solución que contenga el anión

de interés a un pH de 9 a 10, y, al cabo de siete días el material híbrido estará formado. Esta ruta comparada entre moléculas orgánicas pequeñas y moléculas orgánicas de gran tamaño y elevado peso molecular es muy útil en la síntesis con las segundas para obtener nano híbridos, debido a una interacción más lenta conveniente por sus características fisicoquímicas que difieren entre moléculas (Jones y Newman, 1998). Las investigaciones dirigidas a híbridos con función biocida de manera general ya están comenzando a ser desarrolladas en los laboratorios de investigación, especialmente en el sector de salud pública contra bacterias. Observamos que el desarrollo de híbridos con actividad biocida dirigidos al sector agrícola y específicamente para mitigar problemas causados por hongos fitopatógenos es un asunto más reciente, listo para ser explorado. La génesis de híbridos comienza teniendo como bases teóricas y experimentales sobre compuestos orgánicos o compuestos biológicamente activos que ya hayan sido estudiados y que tengan ciertas características biocidas y el potencial de ser unidos a matrices con el objetivo de mejorar sus condiciones de uso y aumentar su resistencia a la degradación.

Antecedentes

Dentro de los estudios con extractos esenciales podemos citar un experimento con *HDL* a base de *ZnAl* impregnados con aceite de eucalipto como un eficiente nanomaterial híbrido contra bacterias multirresistentes, en este experimento utilizaron *ZnNO₃* y *AlNO₃* como cationes di y trivalentes y aceite esencial de eucalipto extraído de hojas de eucalipto, la síntesis del *HDL* fue formada a distintas relaciones molares (2, 3, 4) y distintos pH (7.5 y 10) donde la mejor síntesis de este híbrido resultó en una relación molar de 2 y un pH de 9. Las pruebas realizadas *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus sp* dieron como resultados una inhibición de su desarrollo bacteriano a 4 mgmL⁻¹ del material híbrido necesario en el medio, pero también ese material mostró efecto bactericida a 14 mgmL⁻¹. Se potencializa el extracto de eucalipto mediante la matriz *HDL* (Lobo-Sánchez *et al.*, 2018).

Un plaguicida ecológico bio nano híbrido con los mismos cationes intercalando ácido nalidixico, antibiótico de bajo espectro (*ZnAl-NADS*), fue sintetizado para lidar la enfermedad de la pudrición blanda en los huertos de papa (*Solanum tuberosum*), ocasionada por *Pectobacterium carotovorum*. Mediante este mecanismo se buscó reducir la contaminación ocasionada por los antibióticos en las aplicaciones que hacen los productores para controlar la pudrición de papa. Esto debido a un requerimiento menor en la concentración del antibiótico gracias a las propiedades de conservación del *HDL* y de liberación modulada del bio-nano híbrido. Lo concluyeron como una opción a un pesticida ecológico (Morales-Irigoyen *et al.*, 2018). Otros nano híbridos desarrollados a base de *HDL* y benzoato han demostrado también tener un gran poder bactericida, fungicida y un alto potencial como material para el desarrollo de filmes (Geetanjali *et al.*, 2018). Por estas razones, los *HDL* están siendo objeto de es-

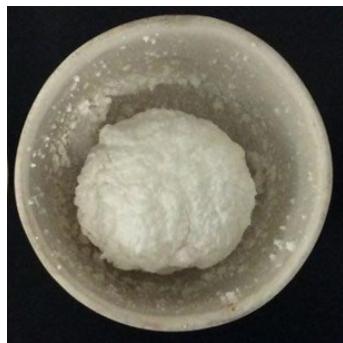
tudio para mejorar sus cualidades y perfeccionar el desarrollo de biomateriales y nanomateriales híbridos con un alto valor en las tecnologías modernas.

Metodología

Síntesis del nanomaterial híbrido (HDL-T)

La síntesis de los materiales se llevó a cabo en el laboratorio II de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la UMSNH. En el desarrollo de este *HDL-T* fue necesario partir de una mezcla de óxidos mixtos ($ZnAl-(O)$); los óxidos mixtos se obtuvieron: se mezclaron dos soluciones de $(Zn(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$ y $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ en una proporción molar de 2 a 1 adicionando sacarosa como medio de combustible y la acción térmica fue efectuada en mufla a 450 °C durante 5 min., para eliminar los residuos carbonosos de la sacarosa, al final del proceso térmico se mantuvo en temperatura constante de 450 °C durante 12 h quedando un material blanco (figura 1) (Kashinath *et al.*, 2002).

Figura 1. Óxido mixto obtenido de la combustión.



Fuente: Elaboración de los autores.

Teniendo los óxidos mixtos $ZnAl-(O)$ como base, se prosiguió con la síntesis del nanomaterial híbrido en un sistema con poca interacción con el ambiente para evitar que las moléculas de CO_2 provenientes de la atmósfera interactuasen en forma de CO_3 debido a su alta afinidad por la región interlaminar de las estructuras *HDL* y evitar competencia entre CO_3 y la molécula de interés: timol. (Miyata, 1983; Béjar, 2016), a través de este proceso se efectuó el mecanismo de reconstrucción de la estructura laminar de los *HDL* (Jones y Newman, 1998), mediante la preparación de una solución donde se mezcló $ZnAl-(O)$ con timol en una relación estequiométrica de 2 a 1, respectivamente, para garantizar la intercalación y/o impregnación del timol (Santana, 2014). Los cristales de timol (Timol, N, F, J. T. Baker, 98% pureza) se diluyeron con 12 mL de H_2O desionizada y descarbonatada con 12 mL de alcohol etílico 96° G. L. Para facilitar la impregnación o intercalación del timol en la matriz *HDL* fue necesaria

una previa des protonación con NaOH 0.1M, procurando un pH entre 9 y 10, estando dentro del margen indicado por otros estudios (Gerhard *et al.*, 1990; Costantino *et al.*, 1999); no obstante, solo se logró una síntesis del *HDL-T* a un pH lo más cercano a valores de 10.5 y 11. El sistema se burbujeó con argón para eliminar CO₂ y se agregó la proporción de óxido mixto una vez purgado; el sistema se mantuvo lo más hermético posible para evitar la interacción de la solución con el CO₂ atmosférico y en agitación constante durante 7 días, pasado este tiempo se centrifugó para obtener el *HDL-T* y se lavó con agua desionizada hasta reducir el pH a 7, el nanomaterial *HDL-T* se secó en estufa durante 24 h a 60 °C para eliminar el excedente de agua (figura 2) y se almacenó.

Figura 2. Nanomaterial híbrido *HDL-T*.



Fuente: Elaboración de los autores.

Caracterización fisicoquímica

Difracción de rayos-X

La difracción de rayos-X (XRD) fue fundamental para corroborar la síntesis correcta mediante la identificación de su estructura cristalina; se realizó en un difractómetro D9 Advance, fabricado por Bruker, operado a 45 Kv y 40 mA, los rayos-X se produjeron a partir de un tubo de cobre con una longitud de onda de 1.5418 Å y se empleó una velocidad de barrido de 0.02° en tiempo de integración de 0.6 s/paso, y un intervalo de barrido de 2θ de 3.5 a 60°; el tiempo total de barrido por muestra fue de 28.5 min, mediante la técnica de Bragg Brentano. Por difracción de rayos-X se aplicó la ecuación de Scherrer para determinar el tamaño de partícula de ZnAl(O) y *HDL-T*.

$$D_{hkl} = \kappa \lambda_{Cu} / \beta \cos \theta_{hkl}$$

Donde κ es el factor de forma del cristal y depende de la geometría, usualmente el factor se atribuye a un valor de 0.9, que corresponde a esférica. λ es la longitud de onda característica del tipo de cátodo emisor de fo-

tones, normalmente es usado uno de cobre, $\lambda_{Cu} = 0.15406$ nm, θ es el ángulo de Bragg y β es el ancho de la reflexión medida a la mitad de la intensidad máxima en radianes (FWHM, por sus siglas en inglés) (Goyeneche, 2018).

Espectroscopía IR por transformada de Fourier

El estudio analítico para identificar compuestos orgánicos fue a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR); su análisis se efectuó en un espectrómetro Nicolet iS10 con un intervalo espectral de 4000-650 cm^{-1} a temperatura ambiente, mediante la técnica de ATR con una resolución de 4 cm^{-1} , velocidad de espejo de 0.4747 y cristal de diamante como detector (Santana 2014, Berrocal 2014).

Análisis termogravimétrico

Se realizó el análisis termogravimétrico de las muestras en un equipo Discovery TGA5500 marca TA Instruments® con una rampa de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 0 a 800 $^{\circ}\text{C}$ y utilizando un flujo de nitrógeno de 25 mL/min como purga (Santana 2014).

Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido

Análisis biológicos

El efecto fungistático contra *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* *in vitro* se determinó en cajas de Petri de 60 por 15 mm, empleando agar papa dextrosa como sustrato, los hongos fitopatógenos se adquirieron en el laboratorio de biotecnología de plantas U-3 de la UMSNH, las pruebas efectuadas se exponen en la tabla 1. La inoculación de los hongos fue instalando un disco de micelio de 5mm de diámetro en el centro de cada placa; la incubación fue en cámara de crecimiento a 25 $^{\circ}\text{C}$. Se empleó dimetilsulfóxido como disolvente.

Tabla 1. Pruebas realizadas contra los hongos fitopatógenos.

Muestra	Concentraciones por cuatriplicado
Control	
Blanco (ZnAl-(O))	50 μgmL^{-1}
Timol puro	5, 25 y 50 μgmL^{-1}
HDL-T	5, 25 y 50 μgmL^{-1}

Fuente: Elaboración de los autores.

El crecimiento radial de los hongos se midió una vez observada de manera subjetiva el crecimiento exponencial total del hongo al ser llenadas las cajas de Petri de los controles por micelio; para el caso de *C. gloeosporioides* el tiempo de incubación total fue de 96 h, y para *B. cinerea* finalizó a las 48 h.



Las pruebas *in vivo* se realizaron contra *B. cinerea*; se inocularon 16 frutos de fresa obtenidos del mercado Independencia de Morelia, Michoacán, con esporas del hongo. La recolección de esporas se realizó mediante raspado de micelio aéreo sobre una caja de Petri inoculada previamente, la cepa se obtuvo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la UMSNH, la cual se dejó envejecer durante diez días en la caja de Petri para una mayor concentración de esporas, figura 3. Una vez obtenido el raspado se procedió a diluir con agua estéril y destilada; posteriormente, se filtró para eliminar micelio e impurezas pasando las esporas por una malla fina de tela. Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer, una vez teniendo un conteo de $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ de esporas en la solución filtrada se procedió a inocular las distintas fresas por inmersión. Las fresas se seleccionaron con características similares, tanto su aspecto físico como de maduración: se les eliminó el pedúnculo y, más adelante, para desinfectarlas, se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio al 2% v/v hundiéndolas durante 20 min, después se enjuagaron con agua esterilizada aplicando lo necesario para eliminar trazas de cloro. Finalmente, se introdujeron por 10 min en las distintas soluciones concentradas; para tener un menor error estadístico y afirmar su reproducibilidad se hicieron cuatro réplicas con cuatro fresas cada una. Las distintas soluciones fueron: solución de timol puro (Timol, N, F, J. T. Baker, 98% pureza) a 25 µg mL^{-1} en dimetilsulfóxido DMSO; solución del nano híbrido HDL - T a 25 µg mL^{-1} en DMSO, un blanco de DMSO puro a 25 µg mL^{-1} y como control se utilizó agua destilada. Se montó un sistema con cajas donde se pusieron las fresas separadas entre sí (figura 4), de tal manera que se sellaron para evitar corrientes de aire y aisladas de los rayos de luz; se llevaron a cámara de crecimiento a 25°C , observando su evolución y tomando medidas del crecimiento radial cada 24 h. Todo el procedimiento fue realizado en campana de flujo laminar. Esas mismas fresas se partieron a la mitad para medir el área interna dañada a causa del hongo una vez terminado el tiempo de incubación.

Figura 3. *B. cinerea*.



Figura 4. Sistema donde se incubaron las fresas.

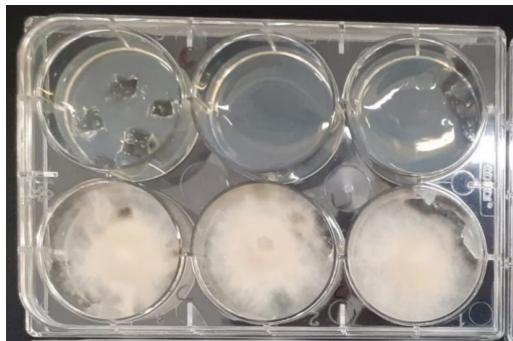


Fuente: Elaboración de los autores.

Análisis de conservación de timol

Este análisis se realizó en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la UMSNH, y el experimento lo propuso el doctor Salvador Jesús López Bucio. La experimentación con cromatografía líquida de alta eficacia HPLC se realizó con un sistema de Water Alliance equipado con desgasificador de vacío, mezcla de solventes cuaternarios, muestreador automático y mezcla de matriz de diodos 2996 de agua. El espectro UV se recogió en el rango 200-900 nm, extrayendo 274 para cromatogramas. Se utilizó la columna ACE C18 (4.6 x 250 µm). La fase móvil fue una combinación isocrática de acetonitrilo y agua, (50:50), inyectando un volumen de 10 µL. Se prepararon dos soluciones, una para el HDL-T en DMSO 12,5 µg/mL, otra para timol puro en las mismas condiciones, estas se prepararon en cajas de Petri con pozos, las mezclas se realizaron con sustrato de agar papa dextrosa y se analizaron por triplicado, se comparó el estudio sin la acción bioquímica del hongo *B. cinerea* y en contraste con la acción del mismo inoculando los centros en los pozos de Petri con discos de 5 mm de diámetro de micelio del hongo previamente envejecido: el análisis constó de obtener alícuotas de 0.5 g de agar solidificado en los muestreos desde el tiempo cero, seguido del tiempo 1 a las 72 h de incubación y se finalizó con un muestreo a las 120 h, donde se observó el desarrollo total del hongo sobre el control (figura 5). Las muestras obtenidas se Trituraron y mezclaron con 1 mL de metanol grado HPLC, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min por dos ocasiones, el metanol obtenido de la separación de fases se analizó en el HPLC para comparar la disminución del área bajo la curva en función del tiempo correspondiente al pico de absorción UV de timol. La solución de timol puro para obtener la referencia o estándar del pico de absorción UV y del tiempo de retención en el HPLC se elaboró en dos distintas concentraciones: 1 µg/mL y 0.2 µg/mL con metanol grado HPLC; el área bajo la curva es directamente proporcional a la concentración de timol por lo que el cambio en la derivada indicó una reducción en la concentración de este.

Figura 5. Cajas de Petri para los muestreos en el análisis de conservación de timol.



Fuente: Elaboración de los autores.

Análisis de resultados

Características fisicoquímicas

La reconstrucción del material se corroboró comparando los difractogramas entre $ZnAl-(O)$ y $HDL-T$; la estructura cristalina del $HDL-T$ se identificó mediante los planos 003 característicos de estos materiales (JCPDS 022-0700) y el ángulo 2 theta de incidencia en 11.63° (figura 6) indicó la presencia de CO_3 intercalado y no permitió la interposición de las moléculas de timol en la región interlaminar (Bernardo *et al.*, 2018; Arízaga y Carbajal, 2016; Wan *et al.*, 2015). Por otra parte, la figura 7 corresponde al difractograma de $ZnAl-(O)$, se reconoció el plano 110, característico de este tipo de compuestos $ZnAl$, asociado con el tamaño de partícula (Miao *et al.*, 2009). Utilizando la ecuación de Scherrer descrita en la metodología, se calculó un tamaño relativo del cristal de 3.97 nm para $ZnAl-(O)$ y de 8.85 nm para $HDL-T$. Este aumento en el tamaño del cristal en el material $HDL-T$ se relaciona con su reconstrucción laminar donde las moléculas intercaladas y la cristalización tienen un papel importante en el tamaño (Santana, 2014).

Figura 6. Difractograma de $HDL-T$.

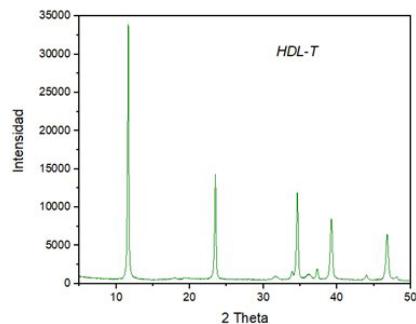
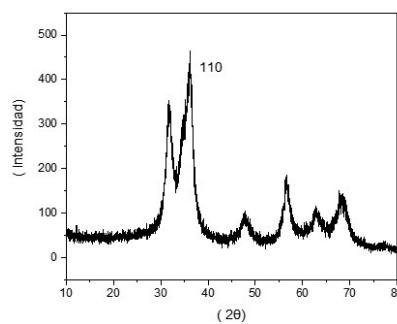


Figura 7. Difractograma para $HDL-T$.



Fuente: Elaboración de los autores.

En las figuras 8 y 9, correspondientes a los espectros IR de $HDL-T$ y del timol puro como un estándar; las moléculas orgánicas de timol presentes pudieron identificarse mediante la huella dactilar en las bandas de absorción desde 1450 a 1600 cm^{-1} que corresponden a $C=C$ del anillo bencénico del timol, también se pudieron identificar en el rango de 1650 y 1830 cm^{-1} vibraciones correspondientes a $C=O$ derivado de flavonoides (Bizuneh, 2014; Wu *et al.*, 2012; Bañuelos-Valenzuela *et al.*, 2018). Por otra parte, las bandas de absorción intensas en 1365 cm^{-1} o cercanas a las bandas de absorción en esa zona, corresponden a los aniones que conforman los HDL , en este caso CO_3 (Santana, 2014), afirmándose la correcta reconstrucción laminar. De esta manera se concluye que el timol se encuentra impregnado y no intercalado en la estructura laminar; sin embargo, se formó el nanomaterial híbrido $HDL-T$ deseado.

Figura 8. Espectro IR de HDL-T.

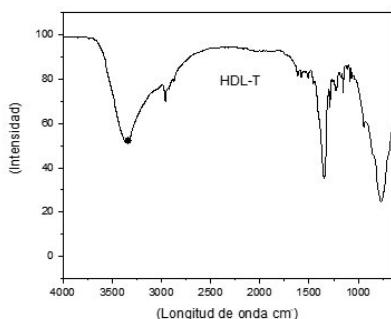
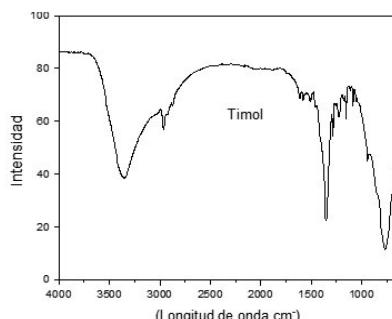


Figura 9. Espectro IR de timol.



Fuente: Elaboración de los autores.

El material $ZnAl-(O)$ (figura 10) mostró una estabilidad térmica hasta los 735 °C: se observaron dos eventos con pérdidas importantes de masa; una de aproximadamente 5% a 100 °C, correspondiente a la pérdida del agua adsorbida en el sólido de óxido mixto ($ZnAl-(O)$), y otra del 5% a 735 °C, que se asoció con la descomposición del material, rompimiento de sus enlaces. En la literatura se reporta la descomposición del óxido de zinc en aproximadamente 300 °C, por lo que se relaciona el incremento de su capacidad calorífica hasta los 735 °C a la adición de Al a esta solución sólida, lo cual indica que el Al le otorgó el doble de capacidad calorífica generando una gran estabilidad ante las temperaturas elevadas.

En la figura 11 se muestra el termograma del análisis TGA correspondiente a $HDL-T$, se manifestó una pérdida de peso de hasta un 30% aproximado en el rango de 100 °C a 230 °C, fue muy probable que esa pérdida haya sido debido al agua fisisorbida en primera instancia y a la descomposición de las moléculas orgánicas del timol en la región cercana a 230 °C. El porcentaje en peso continuó disminuyendo de forma constante hasta llegar a una pérdida total por arriba del 10%; sin embargo, comparado con el termograma de $ZnAl-(O)$ se demostró

Figura 10. Termograma de $ZnAl-(O)$.

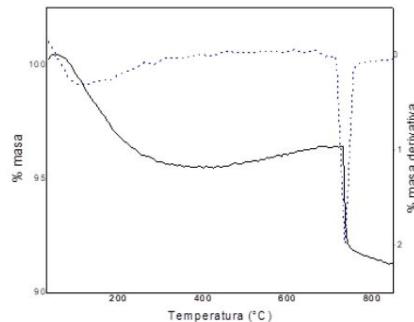
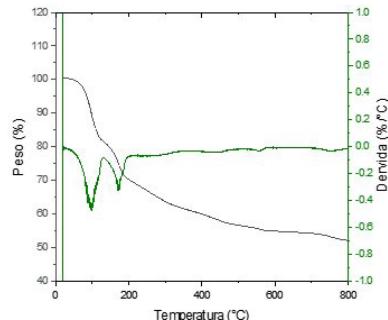


Figura 11. Termograma de $HDL-T$.



Fuente: Elaboración de los autores.

que el material reconstruido en su estructura laminar *HDL-T* perdió mayor porcentaje en peso cuando estuvo en el proceso térmico, esto debido a que por efectos de la temperatura el material vuelve a forma de óxido mixto ($ZnAl-(O)$).

En la figura 12 se observa la morfología del *HDL-T*; su estructura cristalina se evidenció mediante la formación de sus láminas características, su aglomeración de estas fue notoria, sin embargo, se apreciaron de forma concisa las grandes láminas formadas. La coloración grisácea en algunas regiones de los cristales fue debido a los carbonos de las moléculas de timol impregnadas, con lo que se corrobora la presencia de estas moléculas orgánicas. La espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS) permitió analizar la caracterización elemental del material *HDL-T*; se corroboró la presencia de carbono derivado de los compuestos orgánicos (timol) hasta en un 21.4%; sin embargo, parte de ese carbono perteneció a los carbonatos intercalados. Por otra parte, la relación Zn^{+2} y Al^{+3} presente fue de 1.5 : 1, la relación inicial en la síntesis de $ZnAl-(O)$, fue de 2 : 1, la pérdida proporcional en la relación quizás fue debido al proceso de síntesis térmico y de reconstrucción donde se prestó para perder cierta cantidad de los elementos debido al rompimiento de la estructura cristalina y luego a su reconstrucción (figura 13).

Análisis fungistático *in vitro*

El crecimiento radial fue medido al observar el crecimiento exponencial de los hongos fitopatógenos sobre los controles; para el caso de *C. gloeosporioides* el tiempo máximo de incubación fue de 96 h para *B. cinerea* fue de 48 h.

La concentración mínima estudiada para ambos hongos fue de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, corroborando lo que marcan algunos estudios (Berrocal, 2014; Bogdan, *et al.*, 2015). Los datos obtenidos en la medición radial se presentan en las tablas 2 y 3; se observó el claro efecto fungistático del timol puro en contraste con el *HDL-T* a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; por otra parte, se observó de manera subjetiva que los hongos fitopatógenos mostraron inhibición en crecimiento de micelio aéreo,

Figura 12. MED de *HDL-T*.

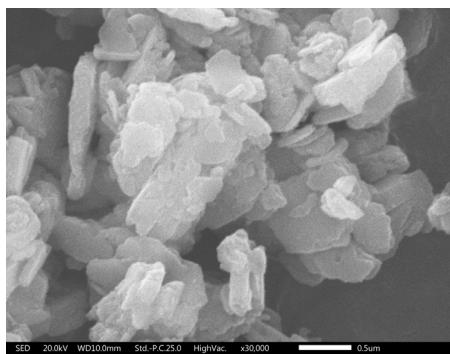
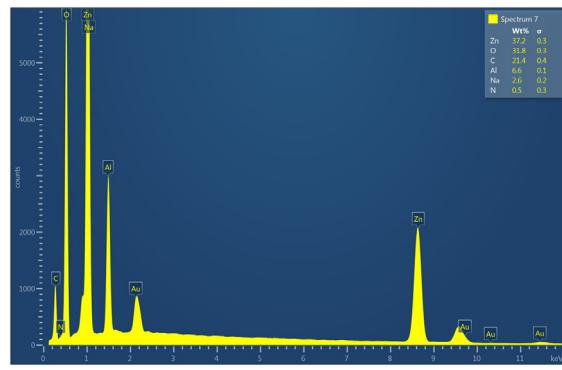


Figura 13. EDS de *HDL-T*.



Fuente: Elaboración de los autores.

se pigmentaron en menor cantidad y en el caso de *B. cinerea*, este buscó crecer hacia el fondo del agar (figuras 14 y 15). Por otra parte, a una concentración de timol o del HDL-T a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, generó un efecto fungicida.

Tabla 2. Inhibición de *C. gloeosporioides*.

Material	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Crecimiento radial (mm)				
		\bar{X}_1	\bar{X}_2	\bar{X}_3	\bar{X}_4	\bar{X}_T
Control	-	17	17.3	17	17	17
Blanco ZnAl-(O)	50	17.6	13	15	15	15.1
Timol puro	5	16.3	16.6	16.3	17.6	16.6
	25	9.6	6.6	5.6	3	6.2
	50	3.3	3	5.6	7	4.7
	5	16	9	14	13	16.3
HDL-T	25	2	2	4	3	2.7
	50	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración de los autores.

Tabla 3. Inhibición de *C. gloeosporioides*.

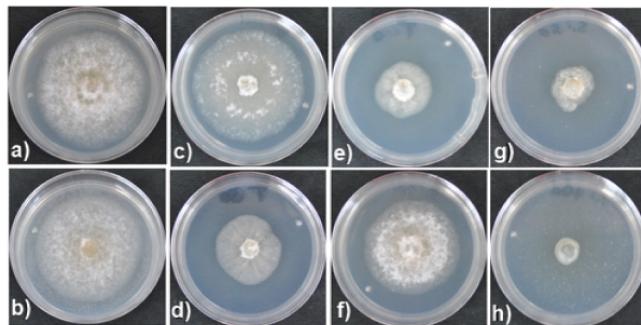
Material	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Crecimiento radial (mm)				
		\bar{X}_1	\bar{X}_2	\bar{X}_3	\bar{X}_4	\bar{X}_T
Control	-	17	17.3	17	17	17
Blanco ZnAl-(O)	50	17.6	13	15	15	15.1
Timol puro	5	16.3	16.6	16.3	17.6	16.6
	25	9.6	6.6	5.6	3	6.2
	50	3.3	3	5.6	7	4.7
	5	16	9	14	13	16.3
HDL-T	25	2	2	4	3	2.7
	50	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración de los autores.

Análisis fungistático *in vivo*

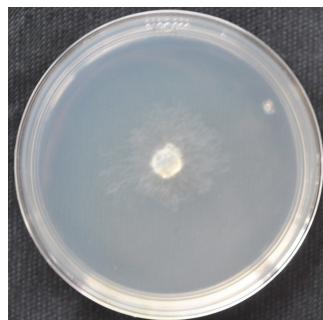
Al transcurrir 120 h de incubación de las fresas inoculadas con *B. cinerea* se observó el desarrollo completo de moho gris correspondiente a este, llenando por completo las fresas el control de micelio aéreo y la descomposición de materia orgánica de las fresas tornándose en una coloración oscura y emitiendo un aroma putrefacto (figura 16), se evidenció una protección a esa descomposición de materia orgánica y alargamiento de la vida de anaquel en

Figura 14. Inhibición de *C. gloeosporioides*.
Pruebas *in vitro*: a) control; b) blanco; c), d) y e) efecto de inhibición del timol a 5, 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; f), g) y h) efecto de inhibición de HDL-T a 5, 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



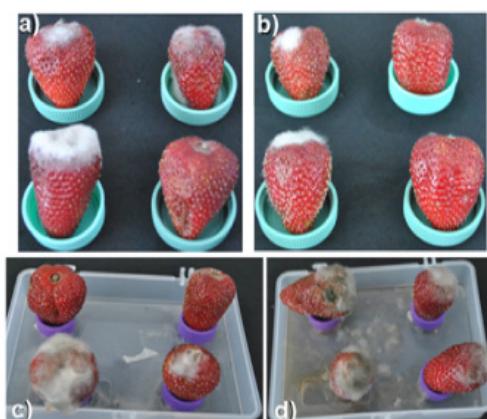
Fuente: Elaboración de los autores.

Figura 15. Inhibición de *B. cinerea*.



Fuente: Elaboración de los autores.

Figura 16. Análisis en fresas inoculadas con *B. cinerea* y tratadas.
Fresas con sus distintos tratamientos: a) y b) con HDL-T, c) con la solución de timol, y, d) control.



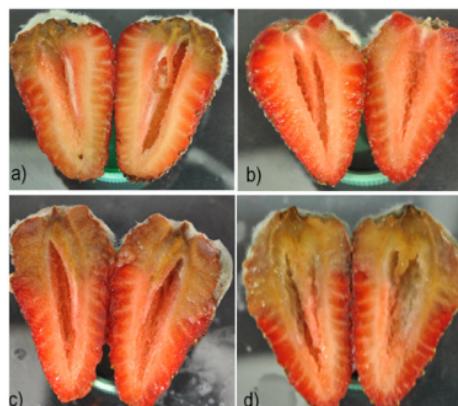
Fuente: Elaboración de los autores.

las fresas tratadas con *HDL-T* y en las tratadas con timol puro. Fue evidente la acción protectora del *HDL-T* contra *B. cinerea*, incluso ligeramente mayor que en las fresas tratadas con timol puro. La pigmentación excesiva del hongo en el control significa un envejecimiento y esporulación.

Al promediar las áreas dañadas se evidenció mediante los datos (figura 17 y tabla 4) un mayor control fitopatógeno en las fresas tratadas con *HDL-T*, superando las tratadas con timol puro.

Figura 17. Daño interno en las fresas inoculadas con *B. cinerea*.

Daño interno de las fresas causado por el hongo fitopatógeno: a) y b) fresas tratadas con *HDL-T*, c) fresa tratada con timol puro, y, d) fresa control.



Fuente: Elaboración de los autores.

Tabla 4. Áreas dañadas internamente de las fresas.

	Areas dañadas (mm)			
	Fresa 1	Fresa 2	Fresa 3	Promedio
Control	897	1,240	555	897
<i>HDL-T</i>	74.4	74	74	222
Timol puro	160	212	108	480

Fuente: Elaboración de los autores.

Análisis de conservación de timol en HPLC

Los datos arrojados por el HPLC fueron tomados directamente de PC del HPLC y están presentados en la tabla 5; el timol se descompone a compuestos secundarios por la acción bioquímica del hongo (Lambert, 2001; Palou-García y García-García, 2008; Berrocal, 2014), además de la pérdida de este por su característica volátil, el *HDL-T* conservó más tiempo al timol evitando en gran medida la pérdida debido a su característica volátil; sin embargo, cuando existe acción de *B. cinerea*, la descomposición del timol es similar si se encuentra solo o como nanomaterial híbrido: para las muestras de timol y

HDL-T pasadas 72 h (T_1) sin acción del hongo, hay una diferencia en pérdida del 19.3% de timol puro respecto al timol mantenido en *HDL-T*, indicando mayor estabilidad en el timol en forma de *HDL-T*, aunque se encontraba impregnado y no intercalado como se mostró en los resultados de difracción de rayos-X; sin embargo, no hay diferencia significativa en el área bajo la curva del pico correspondiente a la absorción UV del HPLC cuando la acción del hongo está presente, ambos se descompusieron en la misma proporción.

Tabla 5. Disminución del área bajo la curva en el análisis HPLC.

Muestra sin hongo	Área bajo la curva de absorción UV en T_0	Área bajo la curva de absorción UV en T_1	Área bajo la curva de absorción UV en T_2	Pérdida de timol %
Timol	153,941	93,533	53,256	65.4
<i>HDL-T</i>	200,592	160.652	133,829	33.28
Muestra con hongo				
Timol	153,941	104.295	8,518	94.4
<i>HDL-T</i>	200,592	102,657	12,916	93.5

Fuente: Elaboración de los autores.

Discusión

El análisis de resultados del experimento en HPLC mostró que la matriz *HDL* le brindó estabilidad a la molécula biológicamente activa timol disminuyendo su volatilidad, lo que hace a este nanomaterial híbrido *HDL-T* una alternativa al control de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* sin que el timol pierda su efecto tóxico en un menor tiempo comparando los efectos de inhibición con otros resultados (Berrocal, 2014; Bogdan *et al.*, 2015). Esto es importante para un futuro desarrollo de fungicidas orgánicos que mantengan moléculas orgánicas como el timol con una mayor estabilidad ante el ambiente. Los nanomateriales a base de *HDL ZnAl* son excelentes matrices para el desarrollo de nanohíbridos hacia su uso en el sector agrícola, lo cual queda demostrado en esta investigación; no solo brindan una alternativa en el sector agrícola, sino que también en el sector alimenticio pensando como un nanomaterial híbrido como conservador de alimentos y evitando hacer uso de conservadores dañinos a la salud como los nitritos.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el nanomaterial sintetizado mostró capacidad de conservación de la molécula biológicamente acti-

va, timol, cuando no hay acción bioquímica de por medio, además se conserva procurando sus características de acción fungistática y fungicida; el aroma característico de timol se percibió notablemente disminuido lo que hace al nanomaterial híbrido mucho más manejable y aplicable que el timol puro, esto nos indica que disminuyó su volatilidad y abre la puerta a futuros desarrollos de nano biofungicidas con base en HDL y extractos esenciales para transitar a tecnologías más amigables con el entorno. Por otra parte, la descomposición de la molécula timol a la misma velocidad contrastándola en estado de híbrido ante la acción bioquímica de *B. cinerea* nos indica que no quedarían residuos de timol si se aplicara *in situ*, evitando contaminación por timol durante muchos años.

Referencias

- Bañuelos-Valenzuela, R. Delgadillo-Ruiz, L. Echavarría-Cháirez, F. Delgadillo-Ruiz, O. y Meza López, C. (2018). Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia*, 52: 309-321. ISSN 2521-9766.
- Barcenas, C. (2005). Química y ecotoxicología de los fungicidas. En J. Rendón von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández A.V. Botello, *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental*. Coatzacoalcos: Universidad Autónoma de Campeche, 191-198.
- Benítez-Leite, S., Macchi, M. L., Fernández, V., Franco, D., Ferro, E. A., Mojoli, A., Cuevas, F., Alfonso, J. y Sales, L. (2010). Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr.* (Asunción), 37(2). Universidad Nacional de Asunción. <https://revistaspp.org/index.php/pediatrica/article/view/202>.
- Benito, P., Labajos, F. y Rives, V. (2009). Microwaves and layered double hydroxides: A smooth understanding. *Pure and Applied Chemistry*, 81(8): 1459-1471. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-07-01>.
- Bernardo, M. P., Guimarães, G. F. Majaron, V. F. y Ribeiro, C. (2018). Controlled release of phosphate from layered double hydroxide structures: dynamics in soil and application as smart fertilizer. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6: 5152-5161. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04806>.
- Bizuneh, A. (2014). GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from cinnamon bark growing in south-west of Ethiopia. *International Journal of Herbal Medicine*, 1, (6): 22-31.
- Bogdan, S., Deyá, C. y Romagnoli, R. (2015). Evaluación de timol para el control antifúngico sobre películas de pintura. *Matéria*, 20(3), sept.: 699-704. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620150003.0073>.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. España: Acribia S. A. ISBN 978-84-200-0956-8.
- C. Patil, K. Aruna, S. T. y Mimani, T. (2002). Combustion synthesis: an update. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(6): 507-512. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00123-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00123-7).

- Costantino, U. Marmottini, F. Nocchetti, M. y Vivani, R. (1998). New synthetic routes to hydrotalcite-like compounds – Characterisation and properties of the obtained materials. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1439-1446. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0682\(199810\)1998](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(199810)1998).
- Costantino, U., Coletti, N. y Nocchetti, M. (1999). Anion exchange of methyl orange into Zn-Al synthetic hydrotalcite and photophysical characterization of the intercalates obtained. *Langmuir*, 15(13): 4454-4460. <https://doi.org/10.1021/la981672u>.
- Damián G. (2017). *Síntesis y caracterización de hidróxidos dobles laminares (HDL) con adición de cationes M4⁺*. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias químicas. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Dean, R., A. L. Van Kan, J. A. Pretorius, Z., E. Hammon-Kosack, K., Di Pietro, A., D. Spanu, P., J. Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y D. Foster, G. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4): 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- Dias de Castro, R., Pereira Andrade de Souza, T., Dornelas Bezerra, L., Lacet Silva Ferreira, G., Melo de Brito Costa, E., M. M. y Leite Cavalcanti, A. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15-417. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0947-2>.
- FAO. (2010). *Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana*. Lima, Perú: FAO-Oficina Sub Regional para América del Sur.
- Feng, L. y Xua, D. (1998). Applications of layered double hydroxides. *Proceedings of the IEEE International Conference on Transmission and Distribution Construction and Live Line Maintenance*, 119: 193-223. https://doi.org/1007/430_007.
- Fernández Béjar, M. (2016). *Síntesis de hidróxidos dobles laminares (HDL) y su aplicación a la eliminación de colorantes aniónicos en disoluciones acuosas*. Tesis de pregrado. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
- Fetter, G., Hernández F., Mauber, A. M. V. H., Lara, V. H. y Bosch, P. (1997). Micro-wave irradiation effect on hydrotalcite synthesis. *Journal of Porous Materials*, 4: 27-30. <https://doi.org/10.1023/A:1009619005529>.
- García-García, R. M. y Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microrganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2(2): 41-51.
- Geetanjali, M., Barsha, D., Sony, P., Diptipriya, S. y Chityal, K. (2018). Comparative evaluation of synthetic routes and antibacterial/antifungal properties of Zn-Al layered double hydroxides containing benzoate anion. *Environmental Engineering Science*, 35(3): 247-260. <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0062>.
- He, J., Li, B., G. D. y Duan, D. (2004). Synthesis of layered double hydroxides in an emulsion solution. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*, 251: 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.09.032>.
- Huerta-Palacios, Holguín-Meléndez, F., Benítez-Camilo, F. y Toledo-Arreola, J. (2009).

- Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides*] (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica L.*) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27 (2): 93-105.
- Jáquez Matas, S., González, L. y Campuzano R. (2008). Instituto Politécnico Nacional. <https://www.repositorydigital.ipn.mx/handle/123456789/16959> (Consultado, enero 3, 2022).
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E. y López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2): 14-23.
- Kumar, Ch. A. y Chul Kang, S. (2014). Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser. typhimurium* *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress *in an ex vivo*. *Research in Microbiology*: 165(7): 559-65. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.001>.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>.
- Lemus-Soriano, B. y Pérez-Aguilar, D. (2017). Manejo de la antracnosis del aguacate con biofungicidas. *Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate*, 4-7 de septiembre, 135-139. Cd. Guzmán, Jalisco, México.
- Lobo-Sánchez, M., Nájera-Meléndez, G., Luna, G., Segura-Pérez, V., Rivera, J. A. y Fetter, G. (2018). ZnAl layered double hydroxides impregnated with eucalyptus oil as efficient hybrid materials against multi-resistant bacteria. *Applied Clay Science*, 153: 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.11.017>.
- López Camacho, R. (2007). Productos forestales no maderables: importancia e impacto de su aprovechamiento. *Colombia Forestal*, 11: 215-231. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2008.1.a14>.
- Martínez Goyeneche, L. (2018). *Determination of particle size by X-Ray diffraction. Trabajo para obtener el grado en física*. Cantabria: Universidad de Cantabria.
- Martínez, D. y G Carbajal, G. (2012). Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Revista de la UDLA, Avances en Química*, 7 (1): 87-99. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93322655011>.
- Meyn, M., Beneke, K. y Lagaly, G. (1990). Anion-exchange reactions of layered double hydroxides. *Inorganic Chemistry*, 29: 5201-5207. <https://doi.org/10.1021/ic00351a013>.
- Miao, S., Naumann d'Alnoncourt, R., Reinecke, T., Kasatkin, I., Behrens, M., Schlögl, R. y Muhler, M. A. (2009). Study of the influence of composition on the microstructural properties of ZnO/Al₂O₃ mixed oxides. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 7: 910-921. <https://doi.org/10.1002/ejic.200800987>.
- Miyata, S. (1975). The syntheses of hydrotalcite-like compounds and their structures and physico-chemical properties: The systems Mg²⁺, Al³⁺, NO₃⁻, Mg²⁺, Al³⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Al³⁺, Cl⁻. *Clays and Clay Minerals*, 23: 369-375. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1975.0230508>.
- Miyata, S. (1983). Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays and*

- Clay Minerals*, 31(4): 305-311. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1983.0310409>.
- Montoya Cadavid, G. de J. (2010). *Aceites esenciales. Una alternativa de diversificación para el Eje cafetero*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. ISBN 958-8280-26-4.
- Morales-Irigoyen, E., Gómez-y-Gómez, Y., Flores-Moreno, J. Franco-Hernández, M. (2018). A bionanohybrid ZnAl-NADS ecological pesticide as a treatment for soft rot disease in potato (*Solanum tuberosum L.*). *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (22): 21439. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9875-7>.
- Newman, P. y Jones, W. (1998). Synthesis, characterization and applications of layered double hydroxides containing organic guests. *New Journal of Chemistry*, 105-115. <https://doi.org/10.1039/A708319J>.
- Numpaque, M., A. Oviedo, L., H. Gil, J., M. García, C. y L. Durango, D. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1): 003-013. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000100001>.
- Oviedo Berrocal, L. (2014) Biotransformación de los sustratos timol y carvacrol mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*. Magister en ciencias-química. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/21049>.
- Rajeshwa, K. y R. de Tacconi, N. (2009). Solution combustion synthesis of oxide semiconductors for solar energy conversion and environmental remediation. *Chemical Society Reviews*, 1984-1988. <https://doi.org/10.1039/B811238J>.
- Ramos Ramírez, E., López Goeme, T. y Gómez, R. (1997). Thermal stability of sol-gel hydrotalcites. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8: 437-442. <https://doi.org/10.1007/BF02436879>.
- Sabourin, E., Mercedes Patrouilleau, M., François Le Coq, J., Vásquez, L. y Niederle, P. (2017). *Políticas públicas y desarrollo de la agroecología en América Latina y el Caribe*. FAO.
- Sánchez Jiménez, C. y Carbajal Arizaga, G. (2016). Sistema de síntesis de hidróxidos dobles laminares con nitrato para reducir contaminación con carbonato y monitoreo de intercambio de nitrato interlaminar. *Avances en Química*, 11(1): 11-16. Universidad de los Andes.
- Santana Cruz, A. (2014). *Materiales híbridos como bactericidas de Escherichia coli*. Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias e ingeniería de materiales. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Azcapotzalco.
- Shapiro, S. y Guggenheim, B. (1995). The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(4): 241-6. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1995.tb00149.x>.
- Simoniello, M., Kleinsorge, E. y Carballo, M. (2010). Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas. *Medicina (Buenos Aires)*, 70: 489-498. <https://www.researchgate.net/publication/262614558>.
- Wan, D., Liu, Y., Xiao, S., Chen, J. y Zhan, J. (2015). Uptake fluoride from water by calcined Mg-Al-CO₃ hydrotalcite: Mg/Al ratio effect on its structure, electrical affinity and adsorptive property. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*

Aspects, 469: 307-314. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.045>.

Wu, Y., Luo, Y. y Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT – Food Science and Technology*, 48: 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>.