



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de ingeniería

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS Y PARÁMETROS BIOLÓGICOS
EN EL CRECIMIENTO DE ALFALFA TRATADA
CON NANOPARTÍCULAS DE M-TiO₂ M= Fe, Ag,
Cu**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Luis Alfonso Páramo Serrano

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Karen Esquivel Escalante

Santiago de Querétaro, Qro.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación de biocompatibilidad del compuesto
Fe-TiO₂/Fe₃O₄ en modelo celular in vitro

por

Luis Alfonso Paramo Serrano

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGMAN-255160



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de ingeniería
Ingeniería en nanotecnología



**EVALUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y PARÁMETROS BIOLÓGICOS
EN EL CRECIMIENTO DE ALFALFA TRATADA CON NANOPARTÍCULAS DE M-
TiO₂ M= Fe, Ag, Cu**

T E S I S

Que como para los requisitos para obtener el grado de
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta

Luis Alfonso Páramo Serrano

Dirigida por

Dra. Karen Esquivel Escalante

SINODALES

Dra. Karen Esquivel

Presidente

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Secretario

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Vocal

Dr. Ramón Guevara González

Sinodal

Four horizontal lines representing the signatures of the members of the thesis committee. The first line has a blue signature, the second has a blue signature, the third has a blue signature, and the fourth has a black signature.

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Agosto, 2020

México

Resumen

Con el aumento en el uso de las nanopartículas se corre el riesgo de que estas puedan entrar en contacto con múltiples seres vivos los cuales pueden ocasionar múltiples efectos toxicológicos, sin embargo, los efectos tóxicos que tienen los nanomateriales pueden ser aprovechados para inducir la producción de metabolitos secundarios en diversas especies de plantas, con objeto de lograr un producto de mayor valor para el consumo humano.

En el presente trabajo se muestran los efectos de la exposición de alfalfa (*medicago sativa*) frente a nanopartículas de M-TiO₂ a 0.1 en porcentaje peso (%W). Las nanopartículas se sintetizaron por medio de la técnica sol gel y sol gel asistido por microondas. La alfalfa se expuso a diferentes concentraciones (50, 100 y 500 ppm) durante un periodo de 80 y 120 días con dosis en aumento. El diseño experimental fue establecido con el propósito de denotar un efecto toxicológico dependiente de la concentración, fase cristalina, método de síntesis, método de introducción de nanopartículas y variaciones en la característica de la nanopartícula como lo es el material a dopar. Las nanopartículas fueron caracterizadas por las técnicas SEM, EDS, XRD, espectroscopia Raman; el efecto toxicológico se evaluó con la medición de parámetros biológicos como el tamaño de tallo principal y secundario, así como la medición de largo y ancho de hoja en ambos tallos, concentración de clorofila y contenido de fenoles, flavonoides y % de inhibición del radical DPPH.

La interacción de la alfalfa con las nanopartículas de dióxido de titanio en ambos métodos de síntesis significó en una reducción de los parámetros como el largo de tallo principal y secundario, largo y ancho de hoja, así como la concentración de clorofila. Se determinó una mayor concentración de metabolitos secundarios en las plantas expuestas a las nanopartículas sintetizadas por el método sol gel acoplado a microondas, siendo indicativo de una planta con un mayor estrés inducido.

Palabras clave: Dióxido de titanio, nanotoxicología, metabolitos secundarios.

Summary

With the increase in the use of nanoparticles, there is a risk that they can come into contact with multiple living organisms, which can cause multiple toxicological effects, however, the toxic effects of nanomaterials can be used to elevate the production of secondary metabolites in various plant species, in order to achieve a product of greater value for human consumption.

In the present work the toxic effects of alfalfa (*medicago sativa*) exposed against M-TiO₂ nanoparticles at 0.1% W, in crystalline phase anatase, synthesized by the sol gel method and sol gel coupled with microwave, with an exposure at different concentrations (50, 100 and 500 ppm) over a period of 80 and 120 days with increasing doses, in order to denote a toxicological effect dependent on the concentration, crystalline phase, synthesis method, nanoparticle introduction method and variations in the characteristic of nanoparticles, such as the material which it is doped, the nanoparticles were characterized by SEM, EDS, XRD, Raman spectroscopy, the toxicological effect were evaluated with the measurement of biological parameters such as the size of the main and secondary stem, as well as the measurement of leaf length and width in both stems, chlorophyll concentration and amount of phenols, flavonoids and inhibition percentage of the DPPH radical, in the sample.

The interaction of alfalfa with the nanoparticles of titanium dioxide in both synthesis methods meant a reduction in the biological parameters such as the length of the main and secondary stem, length and width of the leaf, as well as the concentration of chlorophyll, a higher concentration of secondary metabolites was determined for the nanoparticles synthesized by the sol gel method coupled to microwave, being indicative of a plant with higher stress induced by the nanoparticles.

Key words: Titanium dioxide, nanotoxicology, secondary metabolites.

Dedicatoria

A mi familia amigos y profesores

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por brindarme todo el apoyo y siempre estar para mí sin importar lo que pase, todos mis logros han sido gracias a ustedes.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a los profesores de la carrera de ingeniería en nanotecnología por ser parte de mi desarrollo académico, me llevo un sinnúmero de experiencias y conocimientos que formarán parte de mi desarrollo académico.

A la Dra. Karen Esquivel por brindarme la confianza de pertenecer a su grupo de trabajo lo cual ha sido una grata experiencia para mí, gracias a su asesoramiento, así como la colaboración con mis compañeros del grupo de trabajo me han dado aprendizajes que me han hecho mejor alumno y persona.

A mis compañeros de generación Alejandro, Alan y Ollin los cuales me han acompañado en todo proyecto desde la primera vez que nos juntamos.

A la Dra. Angelica Feregrino por brindarme un espacio de trabajo en su laboratorio lo cual fue parte esencial para el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales los cuales han dedicado tiempo para lectura y revisión de este proyecto, posibilitando la conclusión de esta etapa académica para posteriormente poder continuar con mis estudios de posgrado.

Tabla de contenido

Resumen.....	3
Summary.....	4
Índice de imágenes.....	10
Índice de tablas.....	15
1. Introducción.....	16
2. Justificación.....	19
3. Antecedentes	21
3.1 Nanopartículas.....	21
3.1.1. Óxidos metálicos fotocatalíticos	23
3.2. Nanotoxicología	25
3.3. Generadores de estrés en plantas.....	31
3.3.1. Estrés abiótico.....	32
3.3.2. Estrés biótico.....	33
3.3.3. Nanopartículas como generadores de estrés.....	33
3.4. Metabolitos secundarios y su clasificación	38
3.4.1. Fenoles	39
3.4.2. Alcaloides.....	40
3.4.3. Terpenos	41
3.4.4. Actividad antioxidante	41
4. Hipótesis y objetivos.....	43
4.1. Hipótesis	43
4.2. Objetivo general.....	43
4.3. Objetivos específicos	43
5. Metodología.....	44
5.1. Síntesis de nanopartículas de TiO ₂ por método sol gel	44
5.2. Caracterización fisicoquímica de los materiales	46
5.3. Crecimiento de plantas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>).....	47
5.4. Cuantificación de metabolitos secundarios, capacidad antioxidantes y concentración de clorofila	49
5.4.1. Fenoles	49
5.4.2. Flavonoides.....	50

5.4.3. Determinación de capacidad antioxidante DPPH (2-2-difenil-1-1-picrilhidrazil)	51
6. Análisis y resultados.....	52
6.1. Microscopía electrónica de Barrido (SEM).....	52
6.2. Espectroscopía de rayos X de energía retrodispersada (EDS)	54
6.3. Difracción de rayos X (XRD).....	56
6.4. Espectroscopía Raman.....	58
6.5. Parámetros biológicos de la alfalfa	60
6.5.1. Datos climaticos	60
6.5.2. Germinación y crecimiento.....	62
6.5.3. Deficiencia de nutrientes	63
6.5.4. Alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por método sol gel. 65	
6.5.5. Cuantificación de metabolitos secundarios	74
6.5.5.1. Metabolitos secundarios en alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por medio de sol gel	76
6.5.5.2. Metabolitos secundarios en alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por medio de sol gel acoplado a microondas	88
7. Conclusiones.....	95
8. Perspectivas a futuro.....	97
9. Referencias	98
10. Anexos	111
10.1. Síntesis de nanopartículas de TiO ₂ por medio del método Sol-Gel	111
10.1.1. Microondas para la síntesis de nanopartículas	112
10.2. Técnicas de caracterización	114
10.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	114
10.2.2. Espectroscopía de energía dispersada (EDS)	116
10.2.3. Difracción de rayos X (XRD)	118
10.2.4. Espectroscopía Raman	119
10.2.5. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	121
10.3. Determinación de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante. 123	
10.3.1. Determinación de capacidad oxidante mediante el reactivo DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl) -1- picrylhydrazyl)	123

10.3.2. Determinación de flavonoides mediante el reactivo ácido 2-aminoetildifenilborónico (DPBA)	124
10.3.3. Determinación de fenoles por medio de la técnica Folin-Ciocalteu	125

Índice de imágenes

Figura 1. Aplicaciones desarrolladas para la inclusión de nanomateriales en el area de la agricultura.	16
Figura 2 Cadena de introducción de los nanomateriales al medio ambiente y su escalamiento en la cadena alimenticia.	18
Figura 3 Clasificación de nanomateriales dependiendo de su dimensión.....	22
Figura 4 Elementos en forma iónica que pueden ser usados para el dopaje de nanopartícuas de TiO ₂	24
Figura 5 Mecanismo de fotoactivación del TiO ₂ , generando un par electrón/hueco y produciendo el radical OH•.	25
Figura 6 Características que definen la toxicidad de un nanomaterial y su efectos al entrar en un organismo vegetal.	28
Figura 7 Métodos de introducción de nanopartículas a un sistema vegetal.	29
Figura 8 Diferentes tipos de estrés a los cuales una planta puede estar expuesta.	32
Figura 9 Absorción y translocación de distintos tipos de nanopartículas reportadas en múltiples investigaciones [25].	34
Figura 10 Desglose del metabolismo primario y las rutas de generación del metabolismo secundario.	38
Figura 11 a) Molécula del fenol, el compuesto más simple del grupo de compuestos fenolicos, b) Molécula de rutina, un tipo de flavonoide de estructura compleja.....	39
Figura 12 Estructura de la cafeína, alcaloide presente en el grano del café con alto valor industrial.	40
Figura 13 Molécula de la vitamina A presente en múltiples frutas y verduras, teniendo alta importancia nutricional.....	41
Figura 14 Metodología para síntesis de nanopartículas por medio del método sol-gel y sol-gel acoplado por microondas.	45
Figura 15 Microondas de síntesis Flexiwave Milestone.	45
Figura 16 Microscopio SEM marca JEOL JSM-6060 LV.....	46
Figura 17 Difractómetro de rayos X marca Bruker modelo D8.....	46
Figura 18 Espectrofotómetro Raman marca Horiba Scientific modelo LabRam HR.....	46
Figura 19 Espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Scientific modelo Multiskan GO.	47
Figura 20 Semillero con brotes de alfalfa.....	48
Figura 21 Invernadero con multiples plantas de alfalfa en crecimiento.....	48
Figura 22 Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por el método sol gel, a) TiO ₂ , b) Fe-TiO ₂ , c) Cu-TiO ₂ , d) Ag-TiO ₂	53

Figura 23 Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por el método sol gel acoplado a microondas, a) TiO ₂ , b) Fe-TiO ₂ , c) Cu-TiO ₂ , d) Ag-TiO ₂ .	54
Figura 24 a) Análisis elemental de las nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por medio de la técnica sol gel, con mapeos elementales de b) Cu, c) Fe y d) Ag.	55
Figura 25 a) Análisis elemental de las nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por medio de la técnica sol gel acoplado a microondas, con mapeos elementales de b) Cu, c) Fe y d) Ag.	56
Figura 26 Patrón de difracción de rayos X para a) nanopartículas sintetizadas por el método sol gel y b) sol gel asistido por microondas.	57
Figura 27 Espectro Raman de las nanopartículas de a) TiO ₂ dopado con Ag,Fe,Cu al 0.1%W sintetizadas por medio del método sol gel y b) TiO ₂ dopado con Ag,Fe,Cu al 0.1%W sintetizadas por medio del método sol gel asistido por microondas	59
Figura 28 Datos climáticos obtenidos del observatorio geo electromagnético de la UNAM campus Juriquilla, en el periodo de mayo 2018 a agosto 2018.	60
Figura 29 Datos climáticos del obtenidos del observatorio geo electromagnético de la UNAM campus Juriquilla, en el periodo de mayo 2019 a agosto 2019.	61
Figura 30 Hoja verdadera en plantas de alfa.	62
Figura 31 a) hojas saludables, b) hojas con deficiencia de boro (B), c) hojas con deficiencia de nitrógeno (N) y d) hojas con deficiencia de potasio (K).	64
Figura 32 Largo de tallo a) principal y tallo b) secundario para plantas tratadas con nanopartículas de M-TiO ₂ sol gel durante un periodo de 80 días.	66
Figura 33 a) Largo y b) ancho de hoja en tallo principal, c) largo y d) ancho en tallo secundario para alfalfa tratada por 80 días con nanopartículas sintetizadas por sol gel.	67
Figura 34 Concentración de clorofila medida en unidades SPAD para alfalfa tratada durante 80 días.	68
Figura 35 Largo de tallo principal a) y secundario b) para alfalfa tratada durante 120 días.	69
Figura 36 Largo a), y ancho b) de hojas presentes en tallo principal, largo c) y ancho d) de hojas presentes en tallo secundario para alfalfa tratada durante 120 días.	70
Figura 37 Medición de clorofila en unidades SPAD para alfalfa tratada durante 120 días.	71
Figura 38 Largo de tallo principal a) y tallo secundario b) para alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por el método sol gel acoplado por microondas durante 80 días.	72
Figura 39 Largo a) y ancho b) de hoja en tallo principal y largo c) y ancho d) en tallo secundario para alfalfa tratada por nanopartículas sintetizadas por sol gel acoplado por microondas durante 80 días.	73

Figura 40 Concentración de clorofila en unidades SPAD, para alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por sol gel acoplado por microondas durante 80 días.	74
Figura 41 Ajuste lineal de la recta de concentración de ácido galico.	75
Figura 42 Ajuste lineal de la recta de concentración de rutina.	75
Figura 43 Curva de calibración de la capacidad antioxidante.	76
Figura 44 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en las hojas de la alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 80 días.	77
Figura 45 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en las hojas de la alfalfa tratada con a) Fe-TiO_2 , b) Cu-TiO_2 , durante 80 días.	78
Figura 46 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 80 días.	79
Figura 47 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) Fe-TiO_2 , b) Cu-TiO_2 , durante 80 días.	80
Figura 48 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en raíz de alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 80 días.	81
Figura 49 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en raíz de alfalfa tratada con a) Fe-TiO_2 , b) Cu-TiO_2 , durante 80 días.	82
Figura 50 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en hojas de alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 120 días.	83
Figura 51 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en hojas de alfalfa tratada con a) Fe-TiO_2 durante 120 días.	84
Figura 52 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallos de alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 120 días.	85
Figura 53 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) Fe-TiO_2 , durante 120 días.	86
Figura 54 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en raíz de alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 120 días.	87
Figura 55 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) Fe-TiO_2 durante 120 días.	88

Figura 56 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en las hojas de la alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Cu-TiO_2 .	89
Figura 57 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en hojas de la alfalfa tratada con a) Ag-TiO_2 y b) Fe-TiO_2 .	90
Figura 58 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en el tallo de la alfalfa tratada con a) TiO_2 y b) Cu-TiO_2 .	91
Figura 59 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en el tallo de la alfalfa tratada con a) Ag-TiO_2 y b) Fe-TiO_2 .	92
Figura 60 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en la raíz de la alfalfa tratada con a) TiO_2 y b) Cu-TiO_2 .	93
Figura 61 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en la raíz de la alfalfa tratada con a) Ag-TiO_2 y b) Fe-TiO_2 .	94
Figura 62 Fase de hidrolisis en la reacción solgel.	111
Figura 63 Fase de condensación en la reacción solgel.	112
Figura 64 Diagrama de un microondas multimodal.	114
Figura 65 Recipientes de reacción y soportes para un microondas de síntesis química.	114
Figura 66 Esquema de un SEM.	116
Figura 67 Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO_2 .	116
Figura 68 Diagrama de un EDS.	118
Figura 69 Análisis EDS de nanopartículas de SiO_2 .	118
Figura 70 Ley de Bragg para XRD.	119
Figura 71 Patrón de difracción de rayos X para el óxido de zinc.	119
Figura 72 Posibilidades de dispersión de luz al interactuar con una muestra.	121
Figura 73 Espectro Raman del óxido de zinc.	121
Figura 74 Diagrama de un espectrofotómetro de UV-Vis.	123
Figura 75 Espectro UV-Vis de nanopartículas de oro.	123
Figura 76 Reducción del radical DPPH• por medio de una molécula antioxidante.	124
Figura 77 Reducción del radical DPPH• por medio de una molécula antioxidante.	125
Figura 78 Reducción del radical DPPH• por medio de una molécula antioxidante.	125
Figura 79 Molécula de ácido gálico.	126

Figura 80 Ensayo de Folin-Ciocalteu, la coloración azul aumenta a mayores concentraciones de radicales hidroxil fenólicos. 126

Índice de tablas

Tabla 1. Mecanismo de interacción de las nanopartículas.	30
Tabla 2. Efectos de diversos tipos de nanopartículas en la germinación de distintos tipos de plantas.	35
Tabla 3. Efectos reportados sobre los parámetros de crecimiento en diversas plantas tratadas con nanopartículas.	36
Tabla 4. Efectos sobre los parámetros bioquímicos de plantas tratadas con nanopartículas.	37
Tabla 5. Tabla de soluciones para la generación de la curva de calibración de ácido gálico.	49
Tabla 6. Volúmenes de trolox y metanol para realizar la curva de calibración .	51
Tabla 7. Tamaños de nanopartícula calculados por los métodos de Sherrer y Williamson Hall, grado de cristalinidad y constante de estrés.	57
Tabla 8. Tamaños de nanopartícula calculados por los métodos de Sherrer y Williamson Hall, grado de cristalinidad y constante de estrés.	58
Tabla 9. Temperatura y humedad registrada en el dentro del invernadero.	61
Tabla 10. Tiempo de germinación y desarrollo de hoja verdadera para la alfalfa tratada con nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por el método sol gel.	62
Tabla 11. Tiempo de germinación y desarrollo de hoja verdadera para la alfalfa tratada con nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por el método sol gel acoplado a microondas.	63
Tabla 12. Deficiencias de nutrientes observadas en plantas tratadas con nanopartículas de dióxido de titanio en múltiples concentraciones	64
Tabla 13. Concentraciones y absorbancias de distintas concentraiones de ácido gálico	75
Tabla 14- Concentración y absorbancia de rutina.	75
Tabla 15. Concentración y absorbancia de trolox.	88

1. Introducción

La nanotecnología es una rama de la ciencia que se encarga de la manipulación de la materia en la escala atómica, molecular, o supramolecular con fin de encontrar o mejorar propiedades presentes en un material, su objetivo contempla la innovación de productos y generación de nuevas aplicaciones, su uso crece día con día en múltiples áreas como medicina, electrónica, generación de energías, alimentos, entre otros [1]–[4].

Entre las múltiples áreas donde se puede hacer uso de la nanotecnología se encuentra la agricultura, donde productos modificados con nanomateriales tienen el potencial de solucionar diversas problemáticas que afectan hoy en día los cultivos globales, [5], [6].

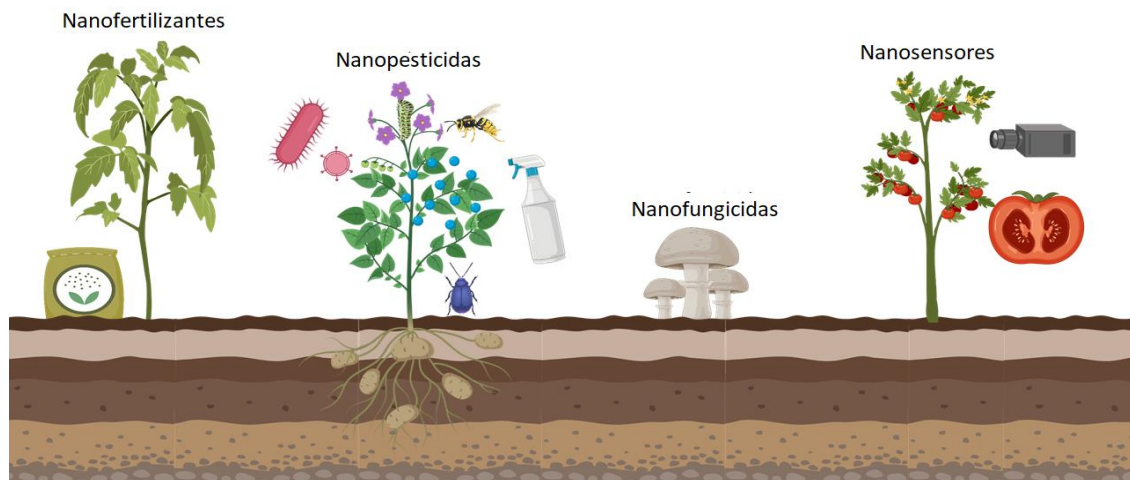


Figura 1. Aplicaciones desarrolladas para la inclusión de nanomateriales en el área de la agricultura.

Entre los productos desarrollados para la agricultura (Figura 1) se pueden mencionar los nanofertilizantes, cuyo principal objetivo es una introducción selectiva y controlada de los nutrientes que son necesarios para el desarrollo de los cultivos, los nanopesticidas y nanofungicidas que presentan menores efectos nocivos para los cultivos y el medio ambiente, siendo selectivos a ciertas

especies de plantas, los nanosensores son instrumentos por los cuales se pueden analizar y medir condiciones a las cuales están sometidas los productos de agricultura con tal de cuantificar y así lograr obtener las condiciones óptimas de cultivo [7]–[9].

Con la adición de áreas que buscan encontrar nuevos desarrollos haciendo uso de los nanomateriales, la producción e introducción de estos materiales al sector industrial va en aumento, se estima que la producción del dióxido de titanio nanométrico (TiO_2) la cual es considerada la nanopartícula más producida mundialmente, llega a ser de más de 10,000 toneladas, otras nanopartículas como CeO_2 , FeO_x , AlO_x , ZnO corresponden a una producción de entre 100-1000 toneladas por año a nivel mundial [10].

Con la introducción de los nanomateriales al medio ambiente ya sea por desechos industriales o aplicaciones que involucren la liberación de nanopartículas a un ecosistema se sigue una cadena de introducción a los seres vivos como se muestra en la Figura 2. Los nanomateriales que provienen de la industria o cualquier uso entran en contacto con el medio ambiente, estos materiales pueden ser absorbidos por organismos vegetales ya que ciertas nanopartículas tienen el tamaño suficiente para atravesar los tejidos de las plantas y acumularse en diversos órganos [11], una vez dentro de las plantas las nanopartículas pueden escalar por la cadena alimenticia, pasando a los animales y por último al ser humano.

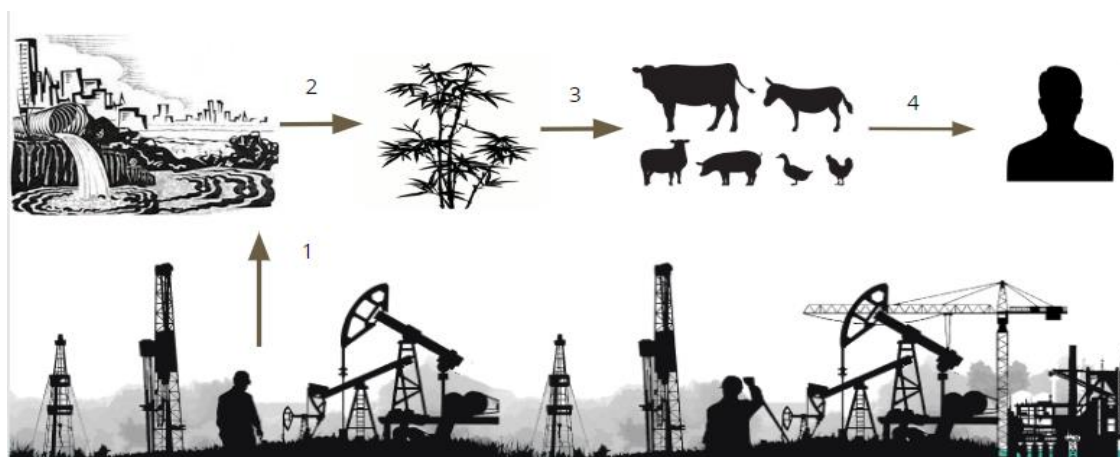


Figura 2 Cadena de introducción de los nanomateriales al medio ambiente y su escalamiento en la cadena alimenticia.

Es bien sabido que los nanomateriales poseen características que los diferencian de sus contrapartes en mayor escala, conocemos los efectos toxicológicos de diversos materiales, sin embargo, estos efectos se presentan en su escala macro, la problemática surge del no conocer los efectos toxicológicos que las nanopartículas presentan, los cuales llegan a ser distintos a su contraparte en bulto. Los efectos tóxicos en animales o vegetales expuestos a nanomateriales son aún desconocidos para el ser humano [12].

La toxicología de ciertos compuestos cuando estos son aplicados en plantas son gran tema de interés, ya que las plantas se enfrentan a todo tipo de interacciones las cuales pueden afectar su desarrollo [13], [14]. Como mecanismo para mitigar estos efectos, las plantas producen compuestos llamados metabolitos secundarios, estos son productos derivados de las rutas metabólicas primarias [15]–[17].

Entre las diversas interacciones que genera la producción de metabolitos secundarios se ha demostrado que las nanopartículas tienen capacidad de elicitar (proceso de síntesis inducida o mejorada de metabolitos secundarios) en ciertas especies de plantas obteniendo un aumento en la concentración de ciertos grupo de productos del metabolismo secundario [18], [19], obteniendo un

organismo más cargado en contenido nutricional o productos de importancia la industrial.

Varios investigadores han reportado que el uso de nanomateriales presentan ventajas en el desarrollo de diversos cultivos de consumo humano como el trigo, maíz, tomate, lechuga, espinaca, entre otros [20]–[22]. A pesar de encontrar efectos positivos en la introducción de nanomateriales en cierto cultivos, se debe tener precauciones con la interacción de estos materiales con otras especies y su posible introducción en la cadena alimenticia[5].

Entre los materiales para producir nanopartículas destaca el dióxido de titanio (TiO_2), un compuesto ampliamente estudiado y usado en aplicaciones como la remoción de contaminantes emergentes (colorantes, fármacos) debido a sus propiedades fotocatalíticas [23], [24]. Estas propiedades pueden generar efectos tóxicos en diversos organismos y jugar un papel importante en la elicitación de diversas especies de plantas, permitiendo obtener productos de mayor concentración de metabolitos secundarios lo cual significaría en un producto de mayor nivel nutricional, a su vez es de gran importancia comprender los efectos toxicológicos de este compuesto que como ya se ha mencionado antes es el compuesto nanométrico mayormente producido mundialmente [10].

De esta manera este trabajo se enfoca en conocer los efectos toxicológicos del TiO_2 dopado con metales como el Cu^{2+} , Fe^{2+} y Ag^{+1} , en el cultivo de alfalfa (*medicago sativa*) mediante la evaluación de su contenido en metabolitos secundarios y su actividad antioxidante. Se determinaron los efectos que induce dicho material en el desarrollo de la planta con el fin de evaluar a grandes rasgos si este puede o no ser consumido por el ser humano, implementando protocolos de bioseguridad y/o nanotoxicología.

2. Justificación

La toxicología de los nanomateriales está sujeta a múltiples características, los efectos cuánticos que se presentan a estas escalas y confieren las propiedades de los nanomateriales juegan un rol importante, sin embargo propiedades como

dosis, concentración, tamaño de partícula, estado de agregación, reactividad, forma, estructura cristalina entre otras características como las vías de administración al organismo [25] son factores importantes que definen el efecto toxicológico que se generará en el organismo. Son aspectos importantes de analizar para definir la toxicología del nanomaterial, teniendo en cuenta que cada una de estas propiedades puede ser modificable dependiendo del procesamiento de la nanopartícula y la metodología a seguir, lo cual puede generar interacciones diferentes con un organismo vivo sin importar que sea el mismo tipo de material involucrado [12].

A su vez estas investigaciones nos permiten descubrir nuevas aplicaciones del uso de nanopartículas en plantas debido a su potencial efecto en elicitar rutas metabólicas por medio de efectos toxicológicos [26]. Se ha observado que algunas nanopartículas generan cambios positivos en diversas características de ciertas especies de plantas como mayor tamaño, mayor contenido de clorofila, raíces más largas, sin embargo, no es correcto esperar que esa misma nanopartícula proporcione los mismos efectos para otro sistema diferente, de tal manera que podemos hacer uso de las interacciones de un nanomaterial para generar productos de mayor valor [5].

Se ha demostrado que los metabolitos secundarios tienen gran importancia para el ser humano, no solo con efectos benéficos para la nutrición por sus propiedades antioxidantes, abarcando aplicaciones como la generación de fármacos, colorantes, saborizantes, aromatizantes, a su vez aplicaciones como el tratamiento y prevención de enfermedades como el cáncer [27].

La capacidad de un nanomaterial de elicitar el metabolismo secundario dependerá de las propias características de la nanopartícula, sus vías de inclusión al organismo y los efectos toxicológicos que se generen en el organismo, a su vez los efectos toxicológicos y de elicitación son dependientes de la especie con las que los nanomateriales interactúan, pudiendo causar efectos totalmente diferentes en diferentes especies [25].

Esto acarrea una problemática mundial ya que una mayor producción de nanopartículas resulta en una elevada probabilidad de que el medio ambiente sea expuesto a estos materiales, ya sea por aplicaciones directas como los productos de agricultura o indirectas como materiales estructurales, esta introducción de materiales exógenos conlleva a un posible riesgo para los sistemas biológicos presentes en el ecosistema incluido el ser humano [28].

Con fin de comprender los efectos que generan los nanomateriales al entrar en contacto con un organismo vivo surgió una nueva área de estudio, la nanotoxicología, cuyo objetivo es comprender como interactúan dichos materiales con un organismo vivo, con fin de generar los perfiles toxicológicos, llegando a comparar sus efectos tóxicos con sus contrapartes en la escala macroscópica. [29], estos estudios permitirán generar protocolos de protección frente a nano partículas que pueden tener potenciales efectos negativos en el desarrollo de múltiples organismos.

Dicho lo anterior es de gran importancia comprender qué efectos presentan los nanomateriales sobre cultivos de importancia agroindustrial, de tal manera que podamos determinar si la implementación de estos proporciona un bien para el consumo del ser humano u animales y a su vez comprender los efectos toxicológicos dependiendo de la cristalinidad, tamaño de nanopartícula, material y dosis/concentración de tal manera que se puedan relacionar estas características con nanopartículas de características similares.

3. Antecedentes

3.1 Nanopartículas

En principio las nanopartículas son aquellos materiales cuya longitud es de 1-100 nm en al menos una dimensión, sin embargo, mayormente son definidas como aquellas que se encuentran dentro de 1-100 nm [30], estos materiales son altamente estudiados debido a que sus propiedades físicas y químicas son únicas a comparación de los mismos materiales en escalas mayores debido a

efectos de mecánica cuántica y propiedades como mayor área superficial [31]–[33].

Los nanomateriales pueden ser clasificados dependiendo del número de dimensiones las cuales se encuentren dentro de la escala nanométrica (1-100nm) como se muestra en la Figura 3. En la clasificación cero dimensional (0D) todas las dimensiones se encuentran dentro del rango de 1-100 nm por lo cual esta clasificación está mayormente comprendida por materiales como los clusters o las nanopartículas, los nanotubos, fibras o barras pertenecen a la 1D debido a que su largo sobrepasa el rango de 1-100 nm, esa misma analogía puede seguirse para las demás clasificaciones, siendo los materiales 2D los que sobrepasan los 100 nm en 2 dimensiones (ancho y largo) como en películas o recubrimientos y los 3D cuyas 3 dimensiones sobrepasan los 100 nm.

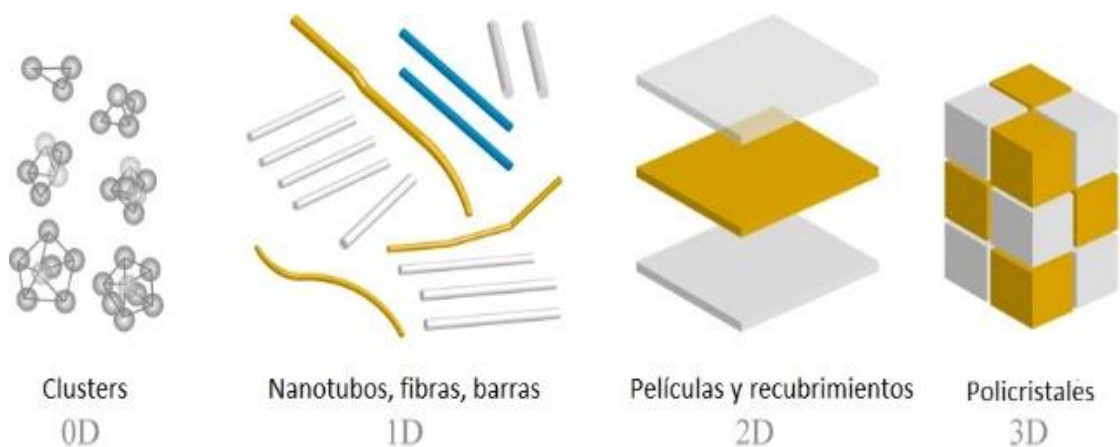


Figura 3 Clasificación de nanomateriales dependiendo de su dimensión.

Las nanopartículas o nanomateriales independientemente de su dimensión pueden ser organizados también en 4 categorías principales dependiendo de su origen [34]:

Nanomateriales a base de carbón, son obtenidos a partir de las estructuras alotrópicas del carbón, formando fullerenos, nanotubos de carbono, grafeno entre otros [35], [36], con grandes aplicaciones en energías y sensores .

Nanomateriales inorgánicos, los cuales incluyen nanopartículas metálicas, óxidos metálicos y semiconductores como los altamente investigados puntos cuánticos, cuyas aplicaciones van desde las áreas médicas, fotocatalisis y generación de energías [37], [38].

Nanomateriales orgánicos, los cuales se enfocan en interacciones no covalentes para el autoensamblaje y el diseño de moléculas que adoptan estructuras como los dendrímeros micelas, liposomas y nanopartículas poliméricas [39], sus aplicaciones se centran en la medicina y los alimentos.

Nanomateriales compósitos, los cuales están hechos con la combinación de múltiples materiales en la nanoescala o en escalas mayores, estos nanocompositos pueden ser de tipo metálicos, orgánicos, cerámicos, poliméricos, estos materiales pueden ser aplicados en cualquier área [40].

3.1.1. Óxidos metálicos fotocatalíticos

Entre los nanomateriales inorgánicos destacan los semiconductores, los cuales han sido objeto de gran interés a lo largo de los años, algunos de ellos tienen la capacidad de absorber la energía presente en ondas electromagnéticas como la luz UV, esto debido a que su banda prohibida (BP) se ubica en el rango del ultravioleta, el proceso electrónico que se genera en estos materiales es usado como catalizador en múltiples reacciones de degradación [41]–[43].

Entre los distintos tipos de semiconductores fotocatalíticos destaca el TiO_2 , cuyas aplicaciones se han centrado en celdas fotovoltaicas, fotocatalisis, fotocromía, sensores y remediación ambiental [43], el dióxido de titanio presenta 3 fases cristalinas cada una con una banda prohibida de distinto valor, anatasa (3.0 eV), rutilo (3.2 eV) y brokita (3.3 eV) siendo la fase anatasa la más usada para las reacciones fotocatalíticas [44]–[46], combinaciones de estas fases como material fotocatalítico también han sido estudiadas con fin de mejorar los procesos de fotocatalisis [47].

Con objeto de modificar el ancho de la banda prohibida y con ello permitir que el TiO_2 absorba energía de longitudes de onda más cercanas al espectro visible se usan diferentes metales como dopantes [48], la implantación de iones es un método comúnmente usado, el cual es dependiente de la concentración de dopante y los patrones de niveles de energía del dopante con el TiO_2 en la red cristalina [44], [48]–[50], como ejemplo, investigadores han reportado una actividad fotocatalítica mejorada cuando se hace uso de dopantes metálicos como el Fe, Mo, Re, V y Rh, los dopantes a usar se distribuyen a lo largo de casi toda la tabla periódica e inclusive pueden usarse dopantes no metálicos como se observa en la Figura 4 [44] .

Li^+	Be^{2+}											B^{3+}	C^{4+}	N^{3-}	O^{2-}	F^-
Na^+	Mg^{2+}		V^{3+}	V^{4+}		Mn^+				Cu^{2+}		Al^{3+}	Si^{4+}		S^{2-}	Cl^-
K^+	Ca^{2+}		Ti^{3+}	V^{5+}	Cr^{3+}	Mn^{3+}	Fe^{3+}	Co^{3+}	Ni^{2+}	Cu^+	Zn^{2+}	Ga^{3+}				Br^-
	Sr^{2+}	Y^{3+}	Zr^{4+}	Nb^{5+}	Mo^{5+}		Ru^{3+}	Rh^{3+}		Ag^+		Li^+	Sn^{4+}	Sb^{5+}		
		La^{2+}		Ta^{5+}	W^{3+}	Re^{5+}	Os^{3+}								Bi^{5+}	
				Ce^{4+}	Sm^{4+}	Nd^{3+}		Eu^{3+}		Tb^{3+}			Er^{3+}	Tm^{3+}	Yb^{3+}	

Figura 4 Elementos en forma iónica que pueden ser usados para el dopaje de nanopartículas de TiO_2 .

El proceso fotocatalítico consiste en la absorción de un fotón ($h\nu$), con energía igual o mayor a la de la banda prohibida esto produce un par electrón-hueco en la superficie de la nanopartícula de TiO_2 (Figura 5) [24], un electrón es promovido a la banda de conducción (BC) mientras que un hueco de carga positiva es formado en la banda de valencia (BV), los electrones y huecos de estados excitados pueden recombinarse y disipar la energía entrante en forma de calor o reaccionar con donadores y aceptores de electrones adsorbidos en la superficie del material [51]. Al reaccionar con agua, estos huecos pueden producir radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) con gran potencial de oxidación, dependiendo

de las condiciones, las especies producidas pueden ser usadas en mecanismos de reacción fotocatalíticos como la degradación de diversos compuestos [50].

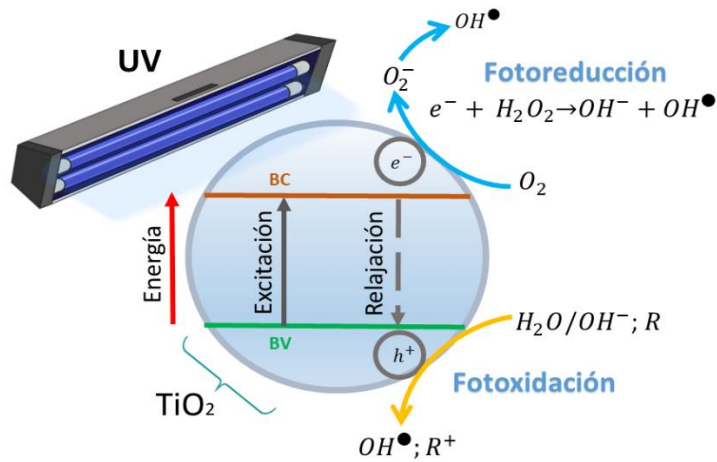


Figura 5 Mecanismo de fotoactivación del TiO_2 , generando un par electrón/hueco y produciendo el radical OH^\bullet .

3.2. Nanotoxicología

Las propiedades físicas y químicas antes mencionadas son a tener consideración cuando se habla de los efectos de las nanopartículas al interactuar sobre un sistema biológico, para esto la nanotoxicología, es un área que se encarga del estudio de los perfiles toxicológicos de los nanomateriales siendo comparados con sus contrapartes en bulto, sus propiedades diferentes debido a efectos cuánticos y un área superficial altamente mayor en relación a su volumen les confieren propiedades que bien pueden generar efectos toxicológicos en un organismo o pasar desapercibidos [52].

Las nanoestructuras son más complejas que algunos otros productos, dado el alto número de aplicaciones, estas pueden ser depositadas en aire, agua, tierra, alimentos o múltiples organismos como plantas, animales y seres humanos [12], el crecimiento rápido en el número de aplicaciones genera que el número de

nanopartículas presentes en el ambiente aumente cada año, esto genera una preocupación sobre los posibles efectos ambientales y de salud a los seres vivos, en adición la nanotoxicología propone la generación de nuevos protocolos de seguridad hacia los nanomateriales [52], [53].

Ciertamente el ingreso de nanopartículas al interior de un ser vivo puede ser sinónimo de complicaciones, sin embargo, con los organismos del reino vegetal estos efectos toxicológicos pueden traer ciertas ventajas [54], las plantas al estar sometidas frente a un tipo de estrés físico o bioquímico tienden a desviar sus rutas metabólicas para la generación de productos secundarios cuyas propiedades tienden a mitigar efectos negativos a los que las plantas son expuestas, dichos compuestos son llamados metabolitos secundarios y contribuyen a olores específicos, sabores y colores en la plantas [55].

Múltiples investigaciones han demostrado que el consumo de metabolitos secundarios generan beneficios a la salud, esto significa que los efectos ocasionados por las nanopartículas en una planta pueden ser aprovechados para generar productos de alto valor agregado [56]–[58].

De acuerdo a datos toxicológicos, la toxicidad de diversos nanomateriales depende de varios factores como:

- **Dosis y tiempo de exposición:** La cual relaciona el número de nanopartículas que penetran las células en un tiempo correspondiente, lo cual depende en la concentración molar de nanopartículas en el medio [59].
- **Estado de agregación y concentración:** Múltiples estudios reportan que al incrementar la concentración de las nanopartículas promueve la agregación de estas lo cual evita la penetración en células debido al aumento en tamaño [60].
- **Tamaño de las nanopartículas:** El variar el tamaño de las nanopartículas ha demostrado que se obtienen diferentes efectos toxicológicos, debido a

que tamaños más pequeños tienen la propiedades de atravesar numerosos tipos de tejidos [61].

- **Forma de las nanopartículas:** Las nanopartículas de un mismo compuesto pueden adoptar diversas formas como esferas, cubos, estrellas, fibras, tubos, etc., el cambio en la morfología puede modificar las propiedades de las nanopartículas y las propias interacciones con los organismos vivos [62].
- **Área superficial:** El efecto toxicológico aumenta al disminuir el tamaño de la nanopartícula y aumentar su área superficial, lo cual permite que haya mayor número de sitios reactivos a comparación de partículas de mayor tamaño [63].
- **Estructura cristalina:** Las fases cristalinas en las nanopartículas les confieren propiedades únicas lo cual genera diversos efectos toxicológicos propios de cada fase que puede tener un material [64].
- **Funcionalización de la superficie:** El modificar la superficie de una nanopartícula con un material diferente puede incurrir en modificar la forma en la que el material interactúa con el organismo pudiendo aumentar o disminuir los niveles de toxicidad [65].
- **Efecto de pre-exposición:** Diversas actividades celulares pueden ser estimuladas por tiempos cortos de exposición, este tipo de pre-exposición puede resultar en una adaptabilidad del organismo hacia las nanopartículas [66].

Las características de la nanopartícula y los efectos antes mencionados son múltiples factores que definen los efectos toxicológicos que se presentarán en una planta, entre estos efectos se presentan modificaciones en la actividad enzimática, contenido de metabolitos primarios y secundarios e inclusive modificaciones en la calidad de producto como se muestra en la Figura 6, las

consecuencias de la interacción de nanopartículas con nanomateriales tiene puede generar efectos positivos tanto como efectos negativos en términos de la calidad del producto.

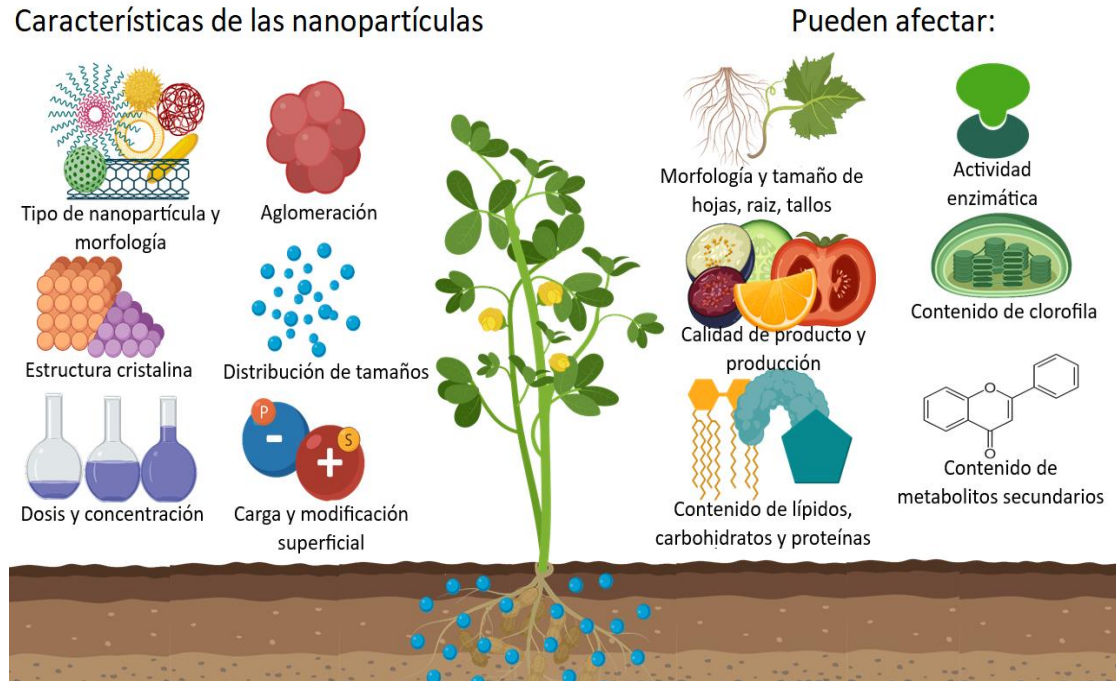


Figura 6 Características que definen la toxicidad de un nanomaterial y su efectos al entrar en un organismo vegetal.

A pesar de ser las características del material las que tengan el rol más importante en los efectos toxicológicos observables, las vías de administración también definirán el tipo de interacciones que se lleven a cabo, en el caso de organismos vegetales se puede hacer uso de múltiples metodologías para la introducción de los nanomateriales como lo son la irrigación, inyección, hidroponía o la incubación en polen, semillas y células tal como se muestra en la Figura 7, estos modos de introducción tienen la capacidad de permitir el ingreso de los nanomateriales a diferentes órganos de la planta y por consecuencias generar efectos toxicológicos variados [25].

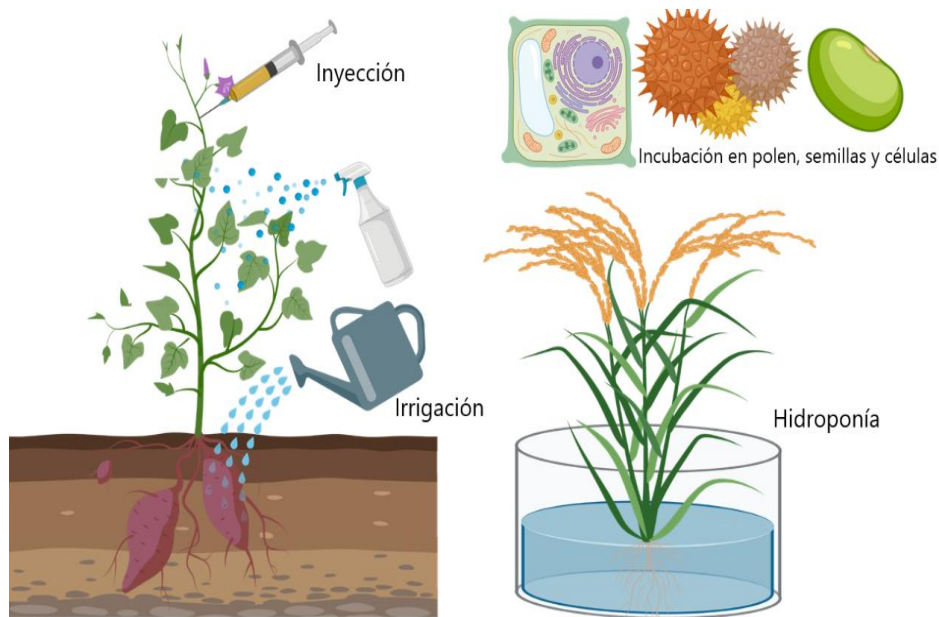


Figura 7 Métodos de introducción de nanopartículas a un sistema vegetal.

Entre las metodologías más usadas para la introducción de nanomateriales se encuentran los siguientes ejemplos:

- **Riego por solución:** siendo el más simple donde la planta es regada con una solución de determinada concentración de nanopartículas [67].
- **Inyección:** por este método una solución de nanopartículas es inyectada en el tallo de la planta, se pueden lograr efectos más claros sin embargo se ignora el hecho de si la planta tiene la habilidad de translocar las nanopartículas por medios convencionales [68].
- **Spray:** La solución de nanopartículas se rocía en la planta, esto ofrece la ventaja de investigar la interacción de las nanopartículas con el tejido (hojas y tallo) de la planta [69].
- **Germinación:** Como párate esencial del desarrollo de la planta es importante conocer el efecto de la nanopartícula sobre la germinación del cultivo [70].

- **Polen:** Las nanopartículas pueden influir en la tasa de éxito del polen para la reproducción de la plantas, el polen se puede ver afectado por la incubación de este en presencia de nanopartículas o por la capacidad de una planta para translocarlas y dirigir las a otros órganos donde se genera el desarrollo del polen [25].
- **Cultivo Hidropónico:** Estos cultivos involucran soluciones con minerales para crecer plantas en agua sin el uso de suelos, de tal forma se puede realizar un mejor contacto de las nano partículas con la planta manteniendo una solución homogénea en todo tiempo [71].

Una vez que las nanopartículas entran en contacto con un ser vivo puede haber tres interacciones principales las cuales están resumidas en la Tabla 1. Las interacciones mecánicas son dependientes del tamaño y trata los efectos relacionados al daño mecánico y obstrucción de vías como tubos vasculares o poros. Las interacciones catalíticas involucran la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las interacciones basadas en la afinidad, contemplan las uniones por enlaces covalente, grupos funcionales o interacciones del tipo lipofílicas [72].

Tabla 1. Mecanismo de interacción de las nanopartículas.

Tipo de Interacción	Ejemplos
Interacciones mecánicas dependientes del tamaño	<ul style="list-style-type: none"> • Obstrucción • Daño a estructuras
Interacciones catalíticas	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de especies reactivas de oxígeno • Catalizadores redox
Interacciones basada en afinidad	<ul style="list-style-type: none"> • Disolución (forma iónica) • Unión covalente • Unión a grupos funcionales • Interacciones lipofílicas

3.3. Generadores de estrés en plantas

El daño toxicológico que puedan generar las nanopartículas están sujetas a sus propiedades químicas y físicas, de tal manera que se pueden obtener múltiples respuestas toxicológicas con un solo tipo de nanopartícula debido a la facilidad de modificar dichas propiedades, estos efectos pueden ser considerados como un estrés, el cual en términos biológicos se define como la desviación en la fisiología, el desarrollo y funciones normales de las plantas, las cuales pueden infligir daño irreversible al sistema vegetal [14].

Para un aumento en la producción de compuestos derivados de las rutas secundarias de las plantas esta debe estar sometida a cierto estrés ya sea físico o bioquímico el cual permita que dichas rutas se activen, los tipos de estrés en las plantas pueden clasificarse en 2 grandes grupos los cuales son de tipo biótico y de tipo abiótico como se muestran en la Figura 8, un concepto importante en esta área es la elicitación, la cual se basa en la introducción de un estrés que logre generar un aumento en la concentración de metabolitos secundarios en las plantas [73].

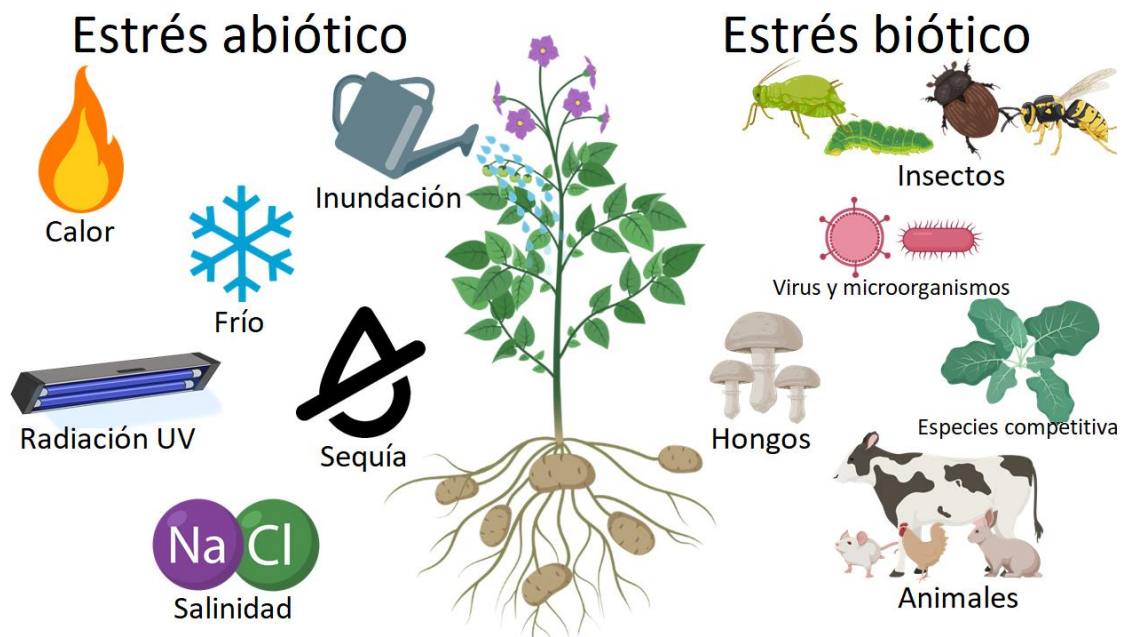


Figura 8 Diferentes tipos de estrés a los cuales una planta puede estar expuesta.

3.3.1. Estrés abiótico

El estrés abiótico está relacionado a las condiciones ambientales con las que las plantas interactúan, si estas condiciones superan los niveles tolerables de los organismos vegetales estos son sometidos a un estrés, entre ellos se encuentran las bajas y altas temperaturas, sequías, alcalinidad, ácidos, salinidad, radiación UV, interacción con metales pesados, u algún otro compuesto químico, entre otros factores [74].

Una de las primeras señales en muchos tipos de estrés abiótico es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, O_2), estas especies generan daño oxidativo a proteínas, DNA y lípidos teniendo un efecto citotóxico, siendo consideradas subproductos tóxicos del metabolismo anaerobio [75], [76]. A pesar del daño citotóxico que estas especies reactivas generan en la planta, estudios han determinado que las plantas generan la producción de ROS frente a la acción de algún estrés, estas especies reactivas funcionan como moléculas transductoras las cuales modifican a la actividad enzimática y la regulación

génica de la plantas lo cual promueve una regulación en las respuestas de las plantas a los estreses abióticos [77], [78].

3.3.2. Estrés biótico

A diferencia del estrés de tipo abiótico, el estrés biótico está compuesto por las interacciones con otros tipos de organismos, insectos, virus, bacterias, animales, hongos e incluso otras especies de plantas pueden introducir ciertos niveles de estrés en una planta, al igual que el estrés abiótico las especies reactivas de oxígeno principalmente H_2O_2 , son producidos como mecanismo de defensa frente a patógenos [77].

Nuevamente los ROS tienen funciones de señalización mediante mecanismos de defensa como lo son los metabolitos secundarios [73], [79], genes y moléculas específicas tienen diferentes roles en la respuesta a cada tipo de estrés y pueden compartir las mismas vías de respuesta, causando que ciertas proteínas sean activadas por estrés de tipo biótico y abiótico, de tal manera metabolitos secundarios como los flavonoides son producidos de igual forma frente a ambos tipos de estrés [80], [81].

3.3.3. Nanopartículas como generadores de estrés

El estrés reportado sobre la germinación de distintas plantas encuentran resultados positivos y negativos, mostrando que pueden afectar procesos metabólicos variados como los son, metabolismo de ADN, hormonal, y fotosíntesis [82], entre múltiples estudios, semillas de lechuga, rábano y pepino fueron tratadas con varias nanopartículas de óxidos metálicos (CuO , NiO , TiO_2 , Fe_2O_3 , Co_3O_4), las nanopartículas de CuO y NiO mostraron resultados perjudiciales en los 3 tipos de semillas mientras que las demás nanopartículas no mostraron un efecto fitotóxico, estas nanopartículas tendían a adsorberse la superficie de la semilla liberando iones metálicos [83], [84].

Un mecanismo por el cual se miden los efectos de las nanopartículas, involucra el estrés oxidativo que como ya se ha mencionado, ocurre cuando las especies reactivas de oxígeno perturban el balance entre la presión oxidativa y la defensa antioxidante [85], [86], usualmente las nanopartículas entran a la raíces de las plantas para ser detenidas por la pared celular, sin embargo el traslado de ciertas nanopartículas a otros órganos es dependiente del tamaño del poro y el de la nanopartícula como se aprecia en la Figura 9 [54], donde cabe destacar que la capacidad de translocación de diferentes tipos de nanopartícula aún es tema de estudio.

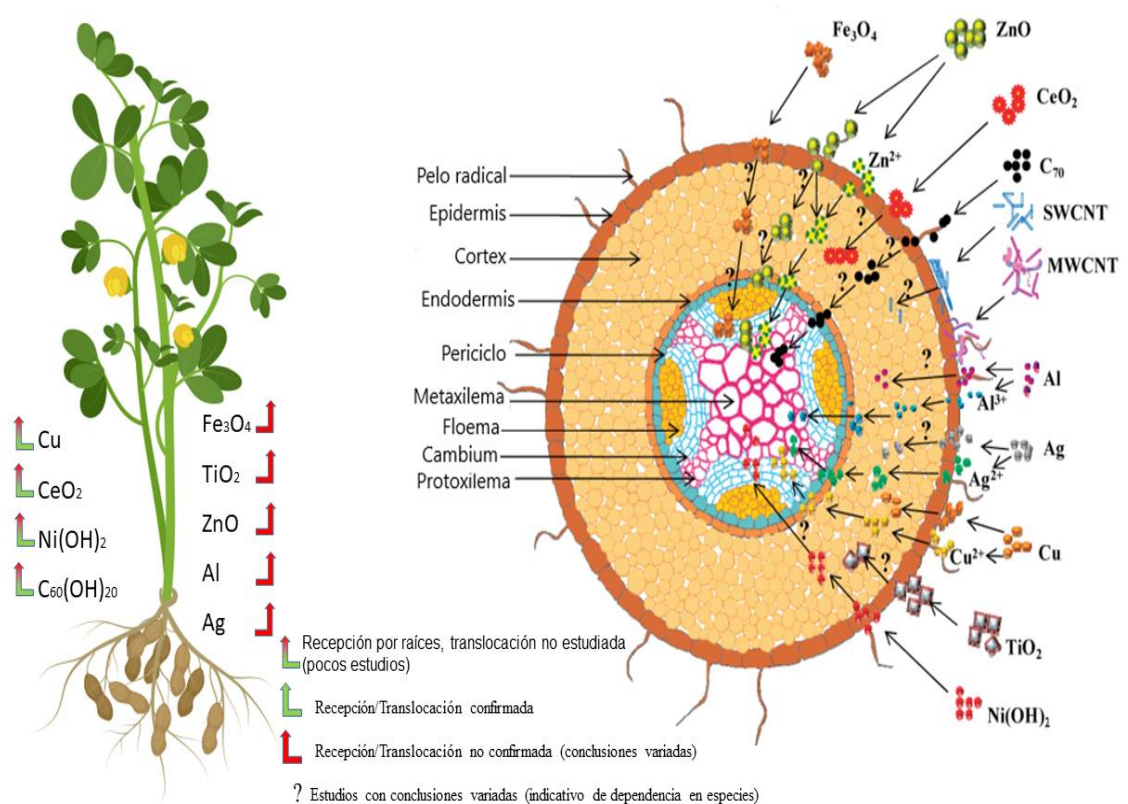


Figura 9 Absorción y translocación de distintos tipos de nanopartículas reportadas en múltiples investigaciones [25].

3.3.3.1. Efectos en la germinación

El proceso de germinación se puede considerar la etapa más importante en el desarrollo de una planta. Se ha reportado que las nanopartículas de SiO_2 en concentraciones relativamente bajas, mejoran la germinación en plantas de tomate [87], las nanopartículas de ZnO no presentan ningún efecto en la germinación de semilla de zucchini cuando esta se desarrolla en cultivos hidropónicos [88]. Múltiples estudios sobre los efectos en la germinación causados por la interacción con nanomateriales se han realizado, la Tabla 2 presenta varios estudios, denotando el tipo de nanopartícula usada, la especie de planta y el efecto registrado.

Tabla 2. Efectos de diversos tipos de nanopartículas en la germinación de distintos tipos de plantas.

Nanopartícula	Planta	Efecto en la germinación	
ZnO	Cacahuete	Positivo	[89]
TiO_2	Hinojo	Positivo	[90]
CeO_2	Alfalfa, tomate, pepino, maíz, soya	Negativo	[91]
Al_2O_3	Lechuga, maíz, pepino	Negativo	[92]

3.3.3.2. Parámetros de crecimiento

El crecimiento de una planta se ve marcado por la germinación de la semilla y el incremento en el tamaño de la raíz, tallos y hojas, estos parámetros son de alta importancia para medir el nivel de desarrollo y calidad de producto, parámetros

como el área foliar y largo tallo son estudiados por varios investigadores cuando se estudia en comportamiento de las plantas en presencia de nanomateriales, en las plantas, en la mayoría de las investigaciones las nanopartículas se añaden directamente al suelo de tal manera que interactúan directamente con las raíces, se han encontrado casos donde mejoran o retardan el proceso de crecimiento de la planta [93], [94].

Muchos de los mecanismos siguen sin comprenderse, en el caso del retardo de crecimiento se entiende que la nanopartícula interactúa con la raíz de la planta bloqueando la entrada de nutrientes y posteriormente trascolándose a otras secciones de la planta, la Tabla 3 presenta diversos estudios sobre los cambios morfológicos de las plantas sufridos tras interactuar con nanopartículas.

Tabla 3. Efectos reportados sobre los parámetros de crecimiento en diversas plantas tratadas con nanopartículas.

Nanopartícula	Especie	Parámetros de crecimiento	
SiO₂	Maíz	Mejora en la germinación, crecimiento del tallo , longitud de raíz.	[95]
TiO₂	Espinaca	Mejora en el desarrollo de espinaca al esparcir las nanopartículas en las hojas	[96]
Al₂O₃	Maíz, pepino, zanahoria, repollo	Disminución en el crecimiento de la raíz y largo de esta	[97]
ZnO	Cacahuete	Mejora en el crecimiento de la raíz	[89]
Co₃O₄	Rábano	Mejoras positivas en la elongación de la raíz	[83]
CeO₂	Maíz, tomate, alfalfa	Disminución en el crecimiento de la raíz	[91]

3.3.3.3. Efectos en la fotosíntesis

Las afectaciones en la morfología de la planta pueden ser causadas por múltiples factores como la obstrucción de los mecanismo de obtención de nutrientes de las plantas o una afectación directa a ciertos tejidos o células vegetales debido a la translocación, de tal manera que mecanismos como la fotosíntesis el cual es el rol fisiológico más importante del reino de las plantas puede ser afectado, este mecanismo involucra la conversión de energía de la luz a energía química en los cloroplastos mediante el uso de clorofila, almacenando los productos como azúcar para su nutrición [98]. Ciertas nanopartículas tienen la capacidad de interferir con los procesos fotosintéticos, habiendo reportes de mejoras, así como efectos negativos como se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Efectos sobre los parámetros bioquímicos de plantas tratadas con nanopartículas.

Nanopartícula	Planta	Parámetro bioquímico	
ZnO	Frijol en racimo	Mejora en el contenido de clorofila en la planta, contenido de proteína, y enzimas metabolizantes de nutrientes basados en P.	[99]
TiO ₂	Trigo	Mejora en el contenido de clorofila	[100]
SiO ₂	Maíz	Mayor contenido de proteína, clorofila y fenoles productos de rutas metabólicas secundarias.	[101]
CuO	Mostaza India	Incrementos significativos en la actividad de la enzima peroxidasa.	[102]

3.4. Metabolitos secundarios y su clasificación

Los efectos tóxicos antes mencionados promueven un estado de estrés en las plantas de tal manera que el uso de las moléculas derivadas del metabolismo secundario es primordial para la supervivencia de esta, los metabolitos secundarios se componen de 3 grupos principales (terpenos, fenoles y compuestos de nitrógeno también llamados alcaloides), derivan de las rutas metabólicas primarias que se observan en la Figura 10, sus aplicaciones varían desde farmacéuticos, aditivos de alimentos (saborizantes, colorantes, fragancias), u agroquímicos como biopesticidas, hasta las ya mencionadas funciones de protección frente a distintos tipos de estresores, [103].

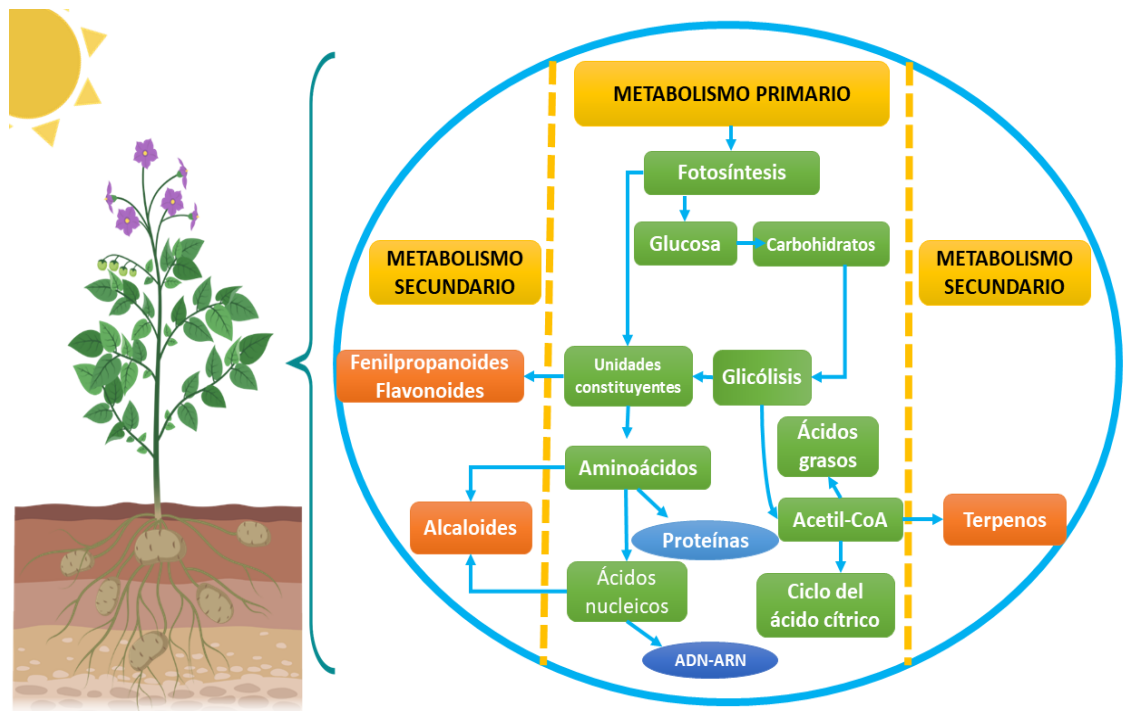


Figura 10 Desglose del metabolismo primario y las rutas de generación del metabolismo secundario.

3.4.1. Fenoles

Los fenoles se encuentran en todo el reino de las plantas componiendo al menos 10,000 estructuras identificadas, se encuentran presentes en hojas, frutas, vegetales y semillas, la mayoría de los compuestos fenólicos son sintetizados vía precursores ligados a las vías del fenilpropanoide, de entre esta categoría destacan los flavonoides siendo una parte esencial del pigmento característico de las plantas, tienen funciones en la reproducción reclutando polinizadores e insectos dispersores de semillas, a su vez protegen al tejido de las hojas de daño foto oxidativo [104]–[106].

La estructura básica de los flavonoides es un sistema $C_6C_3C_6$, dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos, generalmente formando tres anillos de 6 miembros con uno o múltiples grupos hidroxilo (Figura 11-b), estos compuestos se clasifican como antocianinas, flavones, flavonoles, entre otros [16].

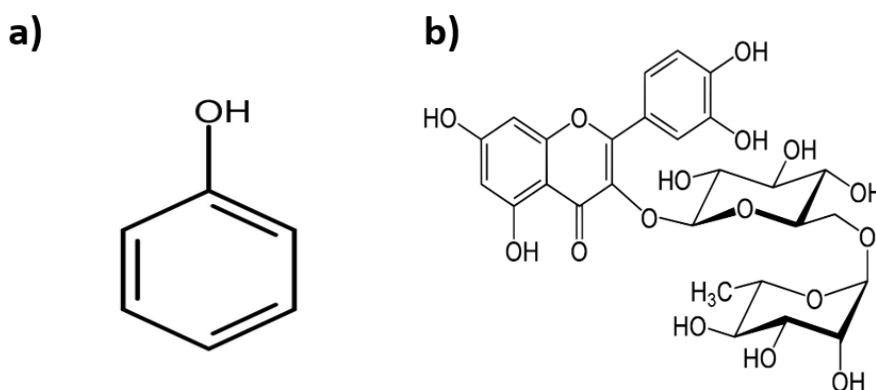


Figura 11 a) Molécula del fenol, el compuesto más simple del grupo de compuestos fenólicos, b) Molécula de rutina, un tipo de flavonoide de estructura compleja.

Los flavonoides también han demostrado tener capacidades antioxidantes protegiendo a la planta en contra de la peroxidación lipídica en las membranas al haber estrés oxidativo, su estructura química les concede la propiedad de ser capturadores efectivos de especies reactivas de oxígeno como lo son el radical peroxilo, hidroxilo y superóxido [106].

3.4.2. Alcaloides

Los alcaloides comprenden otro grupo grande de metabolitos secundarios consistiendo en cerca de 14,000 estructuras conocidas, sin embargo, éstas se presentan en cerca del 25% de las especies de plantas, comúnmente referidas como plantas medicinales, sus aplicaciones se centran en la producción de fármacos debido a la capacidad de activar ciertas vía hormonales que tienen acción anti inflamatoria, o productos con acción antioxidante como el grano de café el cual posee un alcaloide conocido como la cafeína la cual se muestra en la Figura 12, múltiples alcaloides tienen la capacidad de alterar funciones en el sistema nervioso de un ser vivo [103].

Su estructura química es compuesta de elementos como el C, N, H y O, ciertos alcaloides son sintetizados a partir de la condensación del triptófano, estos compuestos son nocivos para ciertos insectos por lo cual ocupan un lugar muy importante en la defensa contra estreses de tipo bióticos [107].

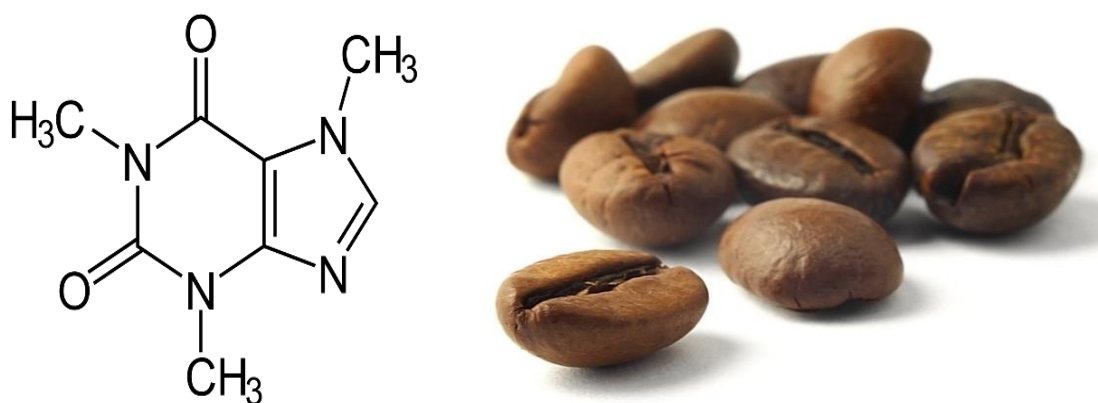


Figura 12 Estructura de la cafeína, alcaloide presente en el grano del café con alto valor industrial.

3.4.3. Terpenos

Los terpenos consisten en un grupo de más de 30,000 moléculas liposolubles, su estructura básica contienen u o más unidades de isopreno, estos se clasifican dependiendo del número de unidades de isopreno, su toxicidad a diversos organismo varía desde mortal a consumible, de tal manera que ocupan diversas funciones desde la protección frente a microorganismo a elementos para la atracción de insectos polinizadores, también actúan como señales químicas aérea, los terpenoides forman un rol muy importante como precursores para hedores volátiles, sustancias de crecimiento, vitaminas como la vitamina A representada en la Figura 13, pigmentos, esteroides, resinas y aceites esenciales [103], [108], [109].

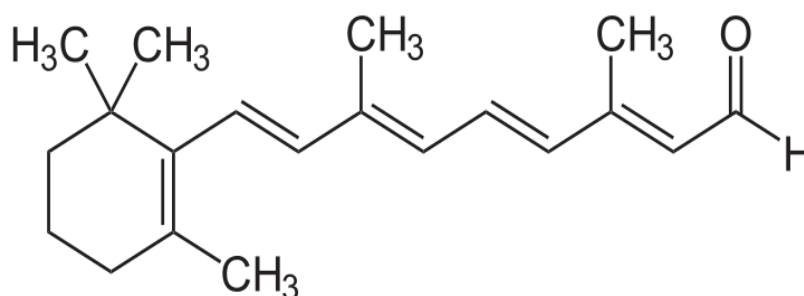


Figura 13 Molécula de la vitamina A presente en múltiples frutas y verduras, teniendo alta importancia nutricional.

3.4.4. Actividad antioxidante

Los radicales libres presentes en las plantas juegan un rol importante en el desarrollo en los daños a tejidos, de tal manera que los antioxidantes actúan como sustancias, que en cantidades pequeñas son capaces de prevenir o retardar la oxidación de materiales altamente oxidables como las grasas, proteínas, ADN y carbohidratos [110]. Las plantas vía su metabolismo secundario, producen moléculas con propiedades antioxidante mayormente los compuestos fenólicos, incluyendo los flavonoides, las antocianinas y los taninos [111], cada compuesto presenta una actividad antioxidante diferente, los

flavonoides tienen la capacidad de retener radicales libres y formar complejos con iones metálicos catalíticos logrando inactivarlos [112].

Los antioxidantes tienen la capacidad de proteger aceites y lípidos presentes en alimentos previniendo la degradación oxidativa causada por otros compuestos, cuando los antioxidantes se agregan a productos alimenticios permiten aumentar la vida en anaquel y mantener la calidad nutricional [113],

La actividad oxidante total (AOT) es un indicador importante para evaluar el estrés oxidativo presente en los organismos [114]. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende del número de grupos hidroxilo presentes en la estructura de los anillos y sus demás arreglos y las posiciones orto le confieren gran estabilidad del radical después de haber sido neutralizado [106].

Tomando en cuenta lo anterior se espera que el dióxido de titanio dopado con diferentes iones metálicos (Ag^{+1} , Fe^{+2} y Cu^{+2}) presente efectos tóxicos a diferentes concentraciones (50, 100 y 500 ppm) en un cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) así como comprender y diferenciar los efectos toxicológicos al dopar la nanopartícula y modificar la metodología de síntesis obteniendo una diferentes características que puedan generar un efecto de elicitación con objetivo de conseguir un cultivo con mayor contenido de metabolitos secundarios.

4. Hipótesis y objetivos

4.1. Hipótesis

El uso de aguas de riego con nanopartículas de TiO_2 y TiO_2 dopado con Fe^{2+} , Cu^{2+} y Ag^{2+} , generará un cambio morfológico significativo en la planta, así como cambios en las rutas metabólicas lo cual dará pauta para la propuesta de protocolos de bioseguridad y nanotoxicología.

4.2. Objetivo general

Evaluar parámetros biológicos de la alfalfa (*Medicago sativa*) regada con suspensiones de dióxido de titanio a concentraciones de 50, 100 y 500 ppm, para determinar el grado de estrés de la misma una vez que ha alcanzado su máximo de desarrollo.

4.3. Objetivos específicos

- Sintetizar nano partículas de TiO_2 , dopadas de Cu, Fe, Ag mediante la técnica sol-gel y sol-gel acoplado por microondas.
- Valorar las características morfológicas, composición y cristalinas de los materiales nanoestructurados por medio de las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRD), espectroscopia de energía dispersada (EDS) y espectroscopia Raman.
- Evaluar el desarrollo físico del cultivo al ser regado con suspensiones de TiO_2 en concentraciones de 50,100 y 500 ppm, midiendo los parámetros de crecimiento como la altura de tallo, tamaño de hoja y la presencia de deficiencias de micronutrientes.

- Determinar y cuantificar la concentración de metabolitos secundarios, mediante la cuantificación de fenoles por la técnica de Folin-Cicoltau, el contenido en flavonoides mediante el ácido 2-aminoetildifenilborínico y la actividad oxidante mediante el uso del reactivo 2,2-di(4-tert-octilfenil) -1-picrilhidrazil, la concentración de clorofila por medio de un espectrofotómetro y los parámetros de germinación de la planta al alcanzar su tiempo máximo de crecimiento.

5. Metodología

5.1. Síntesis de nanopartículas de TiO₂ por método sol gel

El TiO₂ fue sintetizado siguiendo la siguiente metodología la cual está representada en la Figura 14, donde el sol de dióxido de titanio fue sintetizado a partir de una solución de 102 mL de isopropanol (99% Sigma Aldrich) y 10.5 mL de isopropóxido de titanio (97% Sigma Aldrich), esta solución es mantenida bajo una atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación del precursor de titanio, el sistema se mantiene en agitación durante 20 minutos, posteriormente se agrega una solución acuosa (101.5 mL) la cual contiene las sales adecuadas para dopar el dióxido de titanio con iones de Ag¹⁺, Fe²⁺ y Cu²⁺ al 0.1%, usando como sales el nitrato de cobre (JT Baker), nitrato de plata (JT. Baker) y sulfato de hierro (JT, Baker), al agregar la solución de agua y la sal precursora el gel generado se deja agitar durante una 1 hora bajo completa oscuridad, finalmente el gel es filtrado para posteriormente ser secado, molido y calcinado a 450°C en un horno [115].

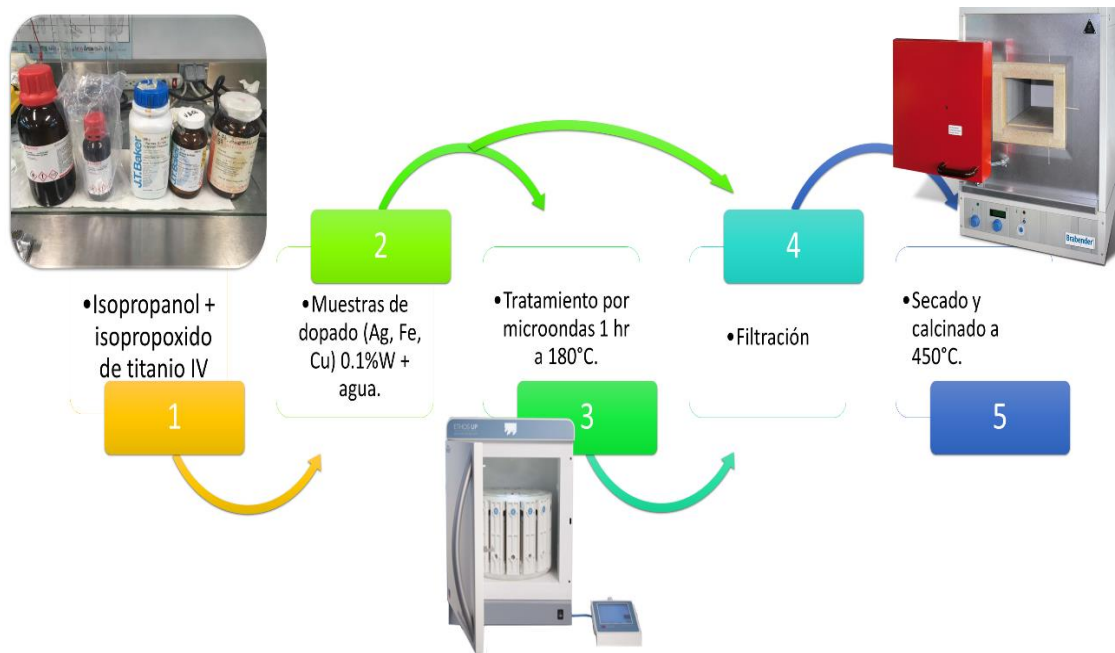


Figura 14 Metodología para síntesis de nanopartículas por medio del método sol-gel y sol-gel acoplado por microondas.

Para acoplar el microondas en la síntesis de TiO_2 se hizo uso de la misma metodología, una vez que el sol gel reacciona durante una hora a oscuridad se procedió a agitar la solución para homogeneizar y se agregó un volumen determinado en cada uno de los viales de reacción del microondas Flexiwave marca Milestone como el que se aprecia en la Figura 15, siguiendo los protocolos de seguridad de uso del horno se procedió a iniciar la irradiación de microondas durante 45 minutos a una temperatura de 180° C, una vez terminado el proceso el producto se filtra, seca y se procede a calcinar durante 3 hr a 450°C



Figura 15 Microondas de síntesis Flexiwave Milestone.

5.2. Caracterización fisicoquímica de los materiales

La morfología de las muestras de TiO_2 fue analizada usando la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) junto con un análisis elemental EDS empleando el microscopio JEOL JSM-6060 LV, de la Figura 16, con voltaje de aceleración de 15 Kv

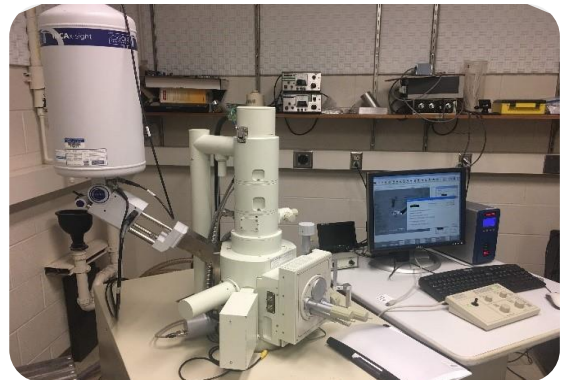


Figura 16 Microscopio SEM marca JEOL JSM-6060 LV.

El análisis cristalino de la muestra se realizó mediante la técnica de difracción de rayos X, se llevó a cabo con el equipo Bruker D8 como el que se aprecia en la Figura 17, equipado con un tubo de cobre sellado para generar radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) con ángulos de $10 < 2\theta < 80^\circ$ en paso de 0.01°



Figura 17 Diffractómetro de rayos X marca Bruker modelo D8.

El análisis vibracional de la red se analizó empleando la técnica de espectroscopía Raman empleando el equipo LabRam HR Horiba Scientific mostrado en la Figura 18, con un láser de NdYGa ($\lambda = 532 \text{ nm}$).



Figura 18 Espectrofotómetro Raman marca Horiba Scientific modelo LabRam HR.

El análisis de metabolitos secundarios se realizó empleando un espectrofotómetro para microplacas Multiskan GO de Thermo Scientific mostrado en la Figura 19, con longitudes de onda de 200 a 1000 nm.



Figura 19 Espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Scientific modelo Multiskan GO.

5.3. Crecimiento de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*)

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) de la marca Vita fueron compradas en un distribuidor local al igual que el sustrato de germinación de marca Jiffy, las semillas fueron posicionadas en un semillero como se muestra en la Figura 20, teniendo una población de 18 plantas para cada concentración de cada grupo de nanopartícula donde se daría un crecimiento de 15 días antes de ser trasplantadas a contenedores de mayor tamaño, durante este periodo las plantas fueron regadas cada tercer día con 10 ml de la respectiva nanopartícula y concentración (50, 100 y 500 ppm) una vez transparentadas a un contenedor de mayor tamaño las plantas fueron regadas bajo la misma periodicidad con 50 ml de solución, las plantas fueron almacenadas en un invernadero de como el que se observa en la Figura 21.



Figura 20 Semillero con brotes de alfalfa.



Figura 21 Invernadero con multiples plantas de alfalfa en crecimiento.

Al completar 80 días de desarrollo se realizaron las mediciones del tallo principal y secundario, así como las mediciones de largo y ancho de hoja en tallo principal y secundario, junto con las determinaciones de concentración de clorofila, posteriormente la mitad de la población fue seleccionada para tomar muestras en grupos de 3 plantas de tallo, raíz y hojas, para ser congeladas haciendo uso de nitrógeno líquido con objeto de evitar la degradación de metabolitos secundarios. Estas muestras son almacenadas en refrigeración y completa oscuridad para su posterior medición. Después de haber completado los 120 días de desarrollo para la mitad restante de la población se repiten las mismas mediciones de largo de tallo, hoja y la medición de clorofila, para de nuevo ser dividida en grupos de 3 y separando hoja, tallo y raíz.

La misma metodología es seguida para las nanopartículas sintetizadas por medio de sol gel asistido por microondas y estas se desarrollaron por un tiempo máximo de 80 días.

5.4. Cuantificación de metabolitos secundarios, capacidad antioxidantes y concentración de clorofila

5.4.1. Fenoles

Para la extracción de compuestos primero se realizó una curva de calibración con una concentración conocida de ácido gálico (0,20,40,60,80,100,120,140,160 μL), el reactivo de Folin y una solución de Na_2CO_3 al 20%W, los cuales son necesarios para la identificación de los compuestos por medio de un cambio de color. La curva de calibración se preparó según la Tabla 5, indicando el orden y la cantidad de reactivo usado.

Tabla 5. Tabla de soluciones para la generación de la curva de calibración de ácido gálico.

Tubo	Sol. Ac, gálico (μL)	H_2O (μL)	Folin (μL)	Na_2CO_3 (μL)
0	0	500	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250
7	140	360	250	1250
8	160	390	250	1250

Una vez llenados los tubos, estos se agitaron en vortex y se dejaron reposar durante 2 horas en completa oscuridad para lograr una reacción completa de los reactivos y evitar la degradación de estos, una vez pasadas las 2 horas las soluciones se analizaron en una longitud de onda de 760 nm.

Para cuantificar la cantidad de ácido gálico presente en muestras orgánicas se agregó en un tubo Falcon 1 g de muestra congelada molida previamente en mortero con nitrógeno líquido, donde se adicionaron 10 mL de metanol, el tubo Falcon fue cubierto en aluminio y agitado durante 24 horas, pasado el tiempo la

muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C, posteriormente se tomó una muestra de 40 µL del extracto metanólico posicionándola en un tubo con capacidad de 2 mL, donde se adicionó 460 µL de H₂O destilada, 250 µL de reactivo de Folin, 1250 µL de Na₂CO₃, el tubo fue agitado en vortex y dejado reposar durante 2 h en la obscuridad, finalmente se colocaron 200 µL en cada pozo y se leyó en el multiskan go a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se reportan como mg equivalentes de ac.gal/g por gramo de muestra orgánica.

5.4.2. Flavonoides

Para la determinación de contenido total de flavonoides se realizó una curva de calibración a distintas concentraciones (200,150,100,50,25,10,5,2 µg/ml) con una solución stock de rutina, pesando 0.025g de rutina y aforando a 10 ml con metanol.

Una vez realizadas las soluciones a concentraciones conocidas se prepararon las placas con las cuales se hizo la determinación por medio de espectroscopía UV-Vis, los experimentos se realizaron por triplicado, donde se colocó 50 µL de cada una de las concentraciones en los pozos de la celda, a cada pozo se adicionó 180 µL de agua destilada y 20 µL de solución 2-aminoetildifenil borato 1%, el blanco se realizó con 230 µL de H₂O destilada o metanol y se adicionaron 20 µL de 2-aminoetildifenil borato al 1%, para posteriormente medir la absorbancia a 404 nm.

Una vez realizada la curva de calibración se procedió a cuantificar la cantidad de flavonoides totales presente en una muestra orgánica, adicionando en un pozo 50 µL del extracto metanólico de la muestra, 180 µL de agua destilada o metanol y 20 µL de sol. 2-aminoetildifenil borato al 1%, nuevamente la placa fue leída en una longitud de onda de 404 nm. Los resultados se reportan como mg equivalentes de rutina/ g muestra orgánica.

5.4.3. Determinación de capacidad antioxidante DPPH (2-2-difenil-1-1picrilhidrazil)

Para cuantificar la capacidad antioxidante se realizó la cinética para verificar el tiempo en el que se neutraliza la actividad estándar contra el DPPH, este compuesto se oxida de una coloración violeta a amarilla, lo cual indica una reacción estequiometria con respecto al núm. de H⁺ absorbidos, la cinética se realizó con un periodo mínimo de mediciones de 90 a 120 min, donde se midió en el multiskan go a una longitud de onda de 520 nm con periodos de tiempo de medición de 0,4,10,30,60,90,120 min, posteriormente se graficaron las concentraciones de trolox (x) con respecto al % de inhibición (y) para verificar la actividad de DPPH.

Solución DPPH:

Se pesaron 0.0015 g de DPPH para aforar a 25 ml, diluyendo primero en 25 ml de metanol y sonicando durante 10 min cubriendo totalmente de la luz.

Solución stock de trolox:

Se pesaron 0.0025 g de trolox para aforar con metanol a 10 mL, con esta cantidad la solución Stock de trolox tuvo una concentración de 1 mM.

En la Tabla 6 se presentan las soluciones de concentración de trolox conocida para realizar la curva de calibración.

Tabla 6. Volúmenes de trolox y metanol para realizar la curva de calibración

#	Trolox stock (µl)	Metanol concentrado (µl)
1	50	950
2	100	900
3	200	800
4	300	700
5	400	600
6	500	500
7	600	400
8	700	300
9	800	200

La curva de calibración se realizó preparando un blanco de 20 µL de metanol y 200 µl de H₂O destilada grado HPLC, el control fue preparado con 20 µL de

metanol y 200 μL de DPPH, el estándar de Trolox se realizó con 20 ml de cada concentración en la posición indicada en la placa anterior y posteriormente se le adicionó 200 μL de DPPH en menos de 1 minuto, la placa finalmente se midió a una longitud de onda de 520 nm,

Una vez realizada la medición se calculó el % Inhibición o de capacidad anti radical cuya ecuación es la siguiente:

$$\%IBH = \left[\frac{(\text{Abs Ctrl} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs Ctrl}} \right] * 100 \quad 1)$$

Dependiendo de la estabilidad de la capacidad oxidante del DPPH se seleccionó el tiempo al cual la muestra puede ser leída, esto puede ser a un tiempo de 30, 60 o 90 min, siendo los 60 min el tiempo usado debido a que en ese tiempo el radical ya es estable, una vez obtenida la curva se prosigue a medir las muestras, colocando por triplicado en los pozos 20 μL de muestra, posteriormente se agregaron 200 μL de DPPH en menos de 1 min, leyendo finalmente la muestra a 520 nm.

6. Análisis y resultados

6.1. Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

La Figura 22 muestra la morfología de la superficie observada con la técnica SEM a una magnificación de 5000x para las nanopartículas de M-TiO_2 , $\text{M} = \text{Ag}^{1+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Cu}^{2+}$, sintetizadas por el método sol gel, siendo la Figura 22 (a) las nanopartículas de dióxido de titanio sin dopar, (b) las nanopartículas dopadas con Fe, (c) las dopadas con Cu y (d) las dopadas con Ag, donde se observa cristales de geometría amorfa y gran tamaño, con pequeños cristales creciendo en la superficie para los 4 tipos de nanopartículas.

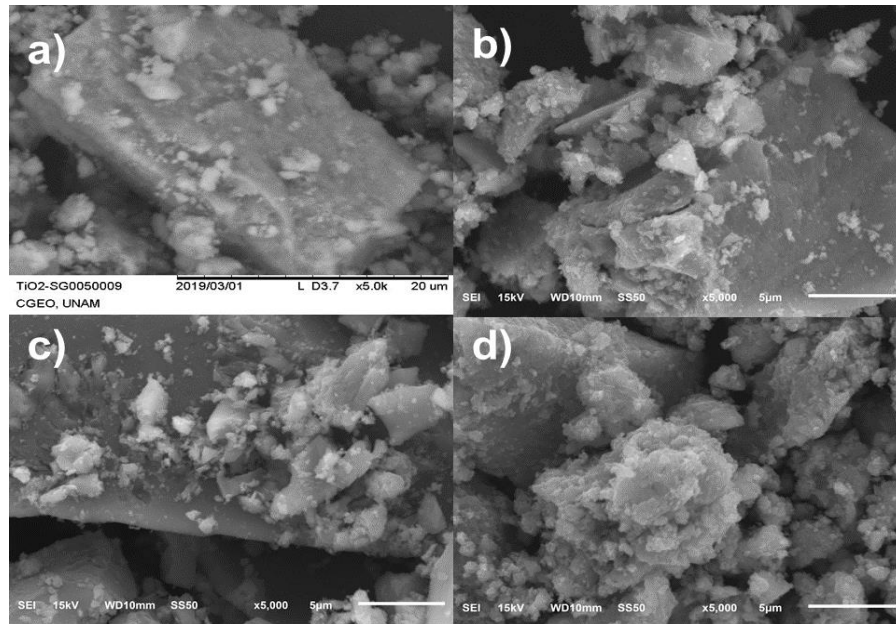


Figura 22 Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por el método sol gel, a) TiO_2 , b) Fe-TiO_2 , c) Cu-TiO_2 , d) Ag-TiO_2 .

En la Figura 23 se muestra la microscopía electrónica de barrido a una magnificación de 5000x de las nanopartículas de M-TiO_2 , $\text{M}=\text{Ag}^{1+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Cu}^{2+}$, sintetizadas por sol gel acoplado por microondas, siendo la Figura 23 (a) las nanopartículas de dióxido de titanio sin dopar, (b) las nanopartículas dopadas con Fe, (c) las dopadas con Cu y (d) las dopadas con Ag, donde a comparación de las imágenes anteriores se observan partículas de TiO_2 más pequeñas con una distribución más homogénea en el tamaño.

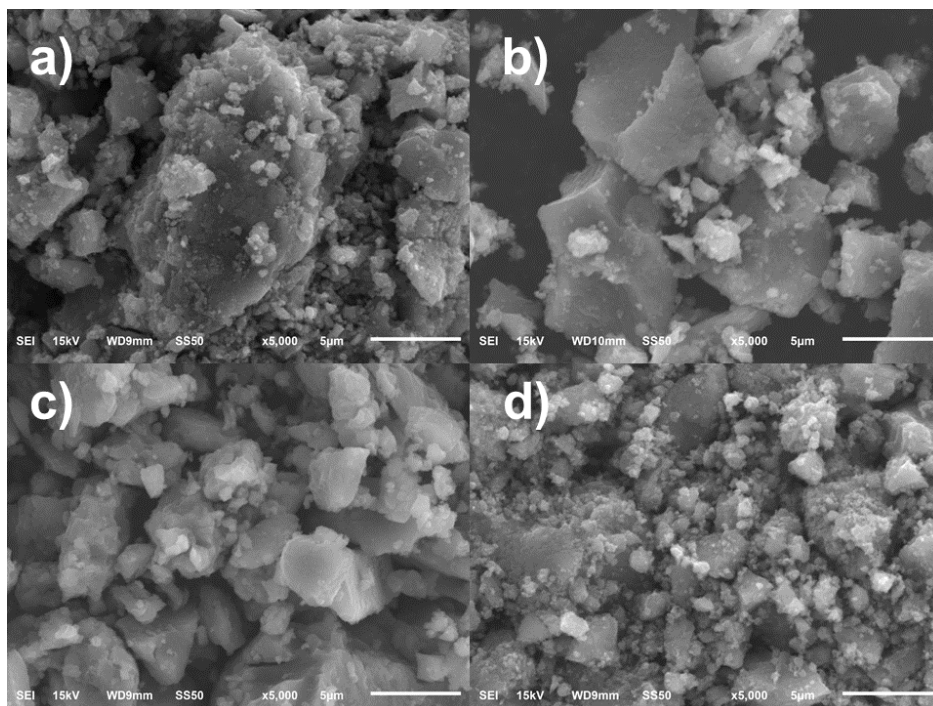


Figura 23 Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por el método sol gel acoplado a microondas, a) TiO_2 , b) Fe-TiO_2 , c) Cu-TiO_2 , d) Ag-TiO_2 .

6.2. Espectroscopía de rayos X de energía retrodispersada (EDS)

En la Figura 24 se muestra la composición elemental de las nanopartículas de M-TiO_2 , $\text{M}=\text{Ag}^{1+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Cu}^{2+}$, sintetizadas por el método sol gel, analizadas por medio de la técnica EDS, donde se puede apreciar la presencia de los elementos Ti y O (Figura 24-a) para las nanopartículas sin dopar, el mapeo elemental para las nanopartículas dopadas (Figura 24-b,c,d) muestra la presencia de los elementos Cu, Fe y Ag presentes en las nanopartículas de TiO_2 .

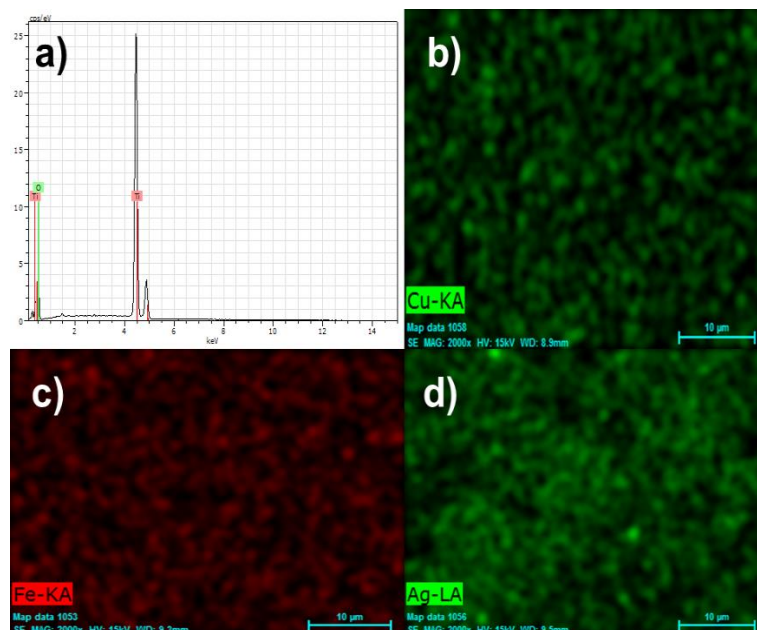


Figura 24 a) Análisis elemental de las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por medio de la técnica sol gel, con mapeos elementales de b) Cu, c) Fe y d) Ag.

En la Figura 25 se muestra la composición elemental de las nanopartículas de M-TiO_2 , $\text{M}=\text{Ag}^{1+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Cu}^{2+}$, sintetizadas por sol gel acoplado por microondas donde se puede apreciar la presencia de los elementos Ti y O (Figura 25-a) para las nanopartículas sin dopar, el mapeo elemental para las nanopartículas dopadas (Figura 25-b,c,d) muestra la presencia de los elementos Cu, Fe y Ag en las nanopartículas de TiO_2 .

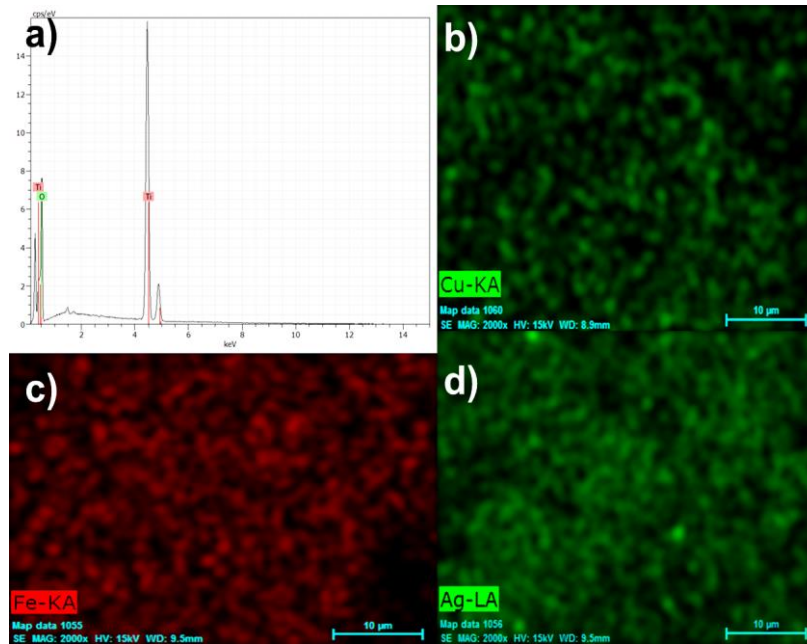


Figura 25 a) Análisis elemental de las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por medio de la técnica sol gel acoplado a microondas, con mapeos elementales de b) Cu, c) Fe y d) Ag.

6.3. Difracción de rayos X (XRD)

En las Figuras 26 se muestran los patrones de difracción de rayos X de las nanopartículas de TiO_2 sin y con dopante, sintetizadas por sol gel y sol gel acoplado con microondas, donde se pueden apreciar las señales en los ángulos 2θ (25.1° , 37.7° , 47.8° , 53.6° , 54.8° , 62.5° , 68.7° , 70.1° y 75.1°), estas 9 señales de difracción son indicativas de la presencia de la fase cristalina anatasa del TiO_2 , donde se puede apreciar un crecimiento preferencial en el plano (101) en ambos métodos de síntesis, sin mostrar presencia de señales de difracción de la fase cristalina rutilo, a su vez no se presencia alguna señal relacionada a los dopantes debido a su baja concentración [115].

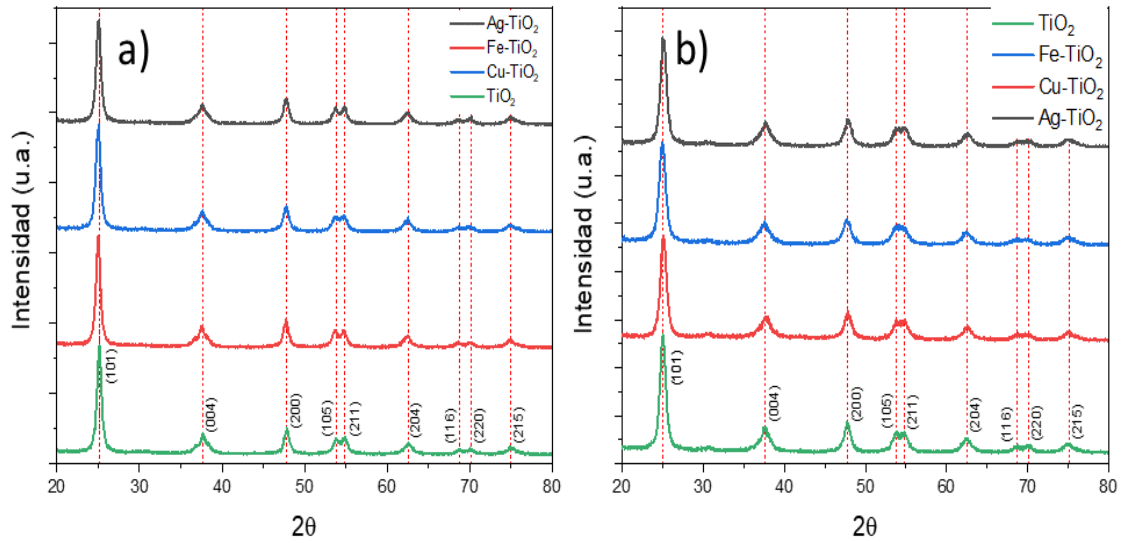


Figura 26 Patrón de difracción de rayos X para a) nanopartículas sintetizadas por el método sol gel y b) sol gel asistido por microondas.

Los tamaños de cristalito para ambos métodos de síntesis fueron calculados por medio de la ecuación de Scherrer y la ecuación Williamson-Hall, siendo ésta última la que considera los efectos de compresión presentes en el cristal para calcular su tamaño de cristalito. Se puede apreciar en la Tabla 7 un mayor tamaño de cristalito con el método de síntesis de sol gel, obteniendo nanopartículas con tamaño promedio de cristalito de 9 nm mientras que el método de Williamson-Hall muestra un tamaño promedio de 17 nm ya que esta ecuación toma en cuenta el estrés la red cristalina, ya sea de compresión, o de relajación, el % de cristalinidad calculado tiene un valor superior al 90%.

Tabla 7. Tamaños de nanopartícula calculados por los métodos de Sherrer y Williamson Hall, grado de cristalinidad y constante de estrés.

Sol-gel	Sherrer (nm)	Williamson-Hall (nm)	Constante de estrés (ϵ)	Grado de cristalinidad (%)
TiO ₂	8.65	19.80	0.0047	93.94
Ag-TiO ₂	9.62	14.00	0.0031	93.15
Fe-TiO ₂	9.28	18.73	0.0048	92.53
Cu-TiO ₂	8.75	16.31	0.0048	92.72

Las nanopartículas sintetizadas por microondas tienen un promedio de 7.4 nanómetros, teniendo en consideración el estrés estructural presente en estas la ecuación de Williamson-Hall muestra un tamaño promedio de 12.2 nm, nuevamente aumentado debido al considerar los efectos estructurales sobre la red cristalina, el porcentaje de cristalinidad calculado tiene un valor superior al 90% de cristalinidad.

Tabla 8. Tamaños de nanopartícula calculados por los métodos de Sherrer y Williamson Hall, grado de cristalinidad y constante de estrés.

Sol-gel acoplado a microondas	Sherrer (nm)	Williamson-Hall (nm)	Constante de estrés (ϵ)	Grado de cristalinidad (%)
TiO ₂	8.04	12.49	0.0038	93.69
Ag-TiO ₂	7.42	12.27	0.0045	92.90
Fe-TiO ₂	6.81	11.45	0.0052	93.20
Cu-TiO ₂	7.69	12.27	0.0043	91.09

6.4. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman muestra los modos vibracionales de los materiales y es altamente usado como técnica complementaria a la difracción de rayos X para el reconocimiento de fases cristalinas. En las Figura 27-a se muestran los espectros Raman de las nanopartículas sintetizadas por el método sol gel y Figura 27-b sol gel acoplado a microondas, encontrando señales en 142.7, 396.8, 517 y 637.7 cm⁻¹, los cuales son indicativos de la presencia de la fase cristalina anatasa, sin mostrar indicios de presencia de las fases brookita y rutilo del TiO₂, a su vez en ambos métodos de síntesis no se aprecia un corrimiento de bandas ni la presencia de nuevas señales, esto debido a la baja concentración de los dopantes, la disminución o aumentos en las señales observadas como es en el caso de las nanopartículas de cobre en la Figura 27-a está relacionada con la calidad cristalina del material o la concentración de dicho material [115].

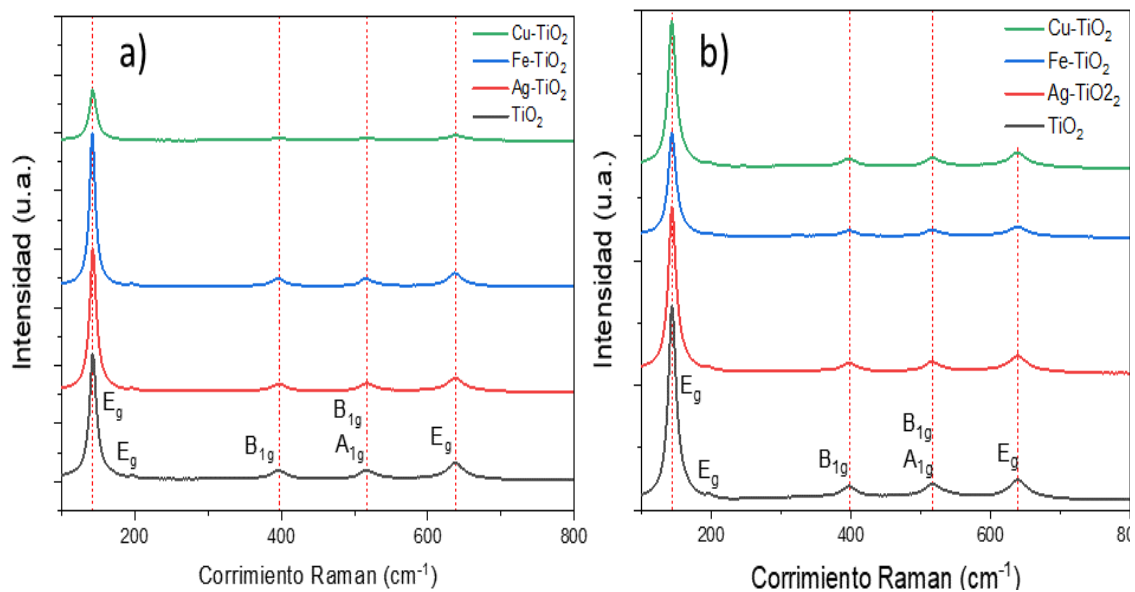


Figura 27 Espectro Raman de las nanopartículas de a) TiO_2 dopado con Ag,Fe,Cu al 0.1%W sintetizadas por medio del método sol gel y b) TiO_2 dopado con Ag,Fe,Cu al 0.1%W sintetizadas por medio del método sol gel asistido por microondas

6.5. Parámetros biológicos de la alfalfa

6.5.1. Datos climaticos

Los datos climaticos durante el periodo de plantado de la alfalfa regada con nanopartículas de TiO_2 (mayo 2018-Agosto 2018), sintetizadas por sol gel fueron tomados del centro de geoelectromagnetismo de la Universidad Nacional Autonoma de México, campus Juriquilla a las 12:00 p.m. cada día (Figura 28), donde en promedio la temperatura durante esos meses varió desde 24.6 a 27.6 °C, con un nivel de radiación de 839.7 a 923.9 W/m^2 , y el indice de radiación UV de 6.2 a 8.

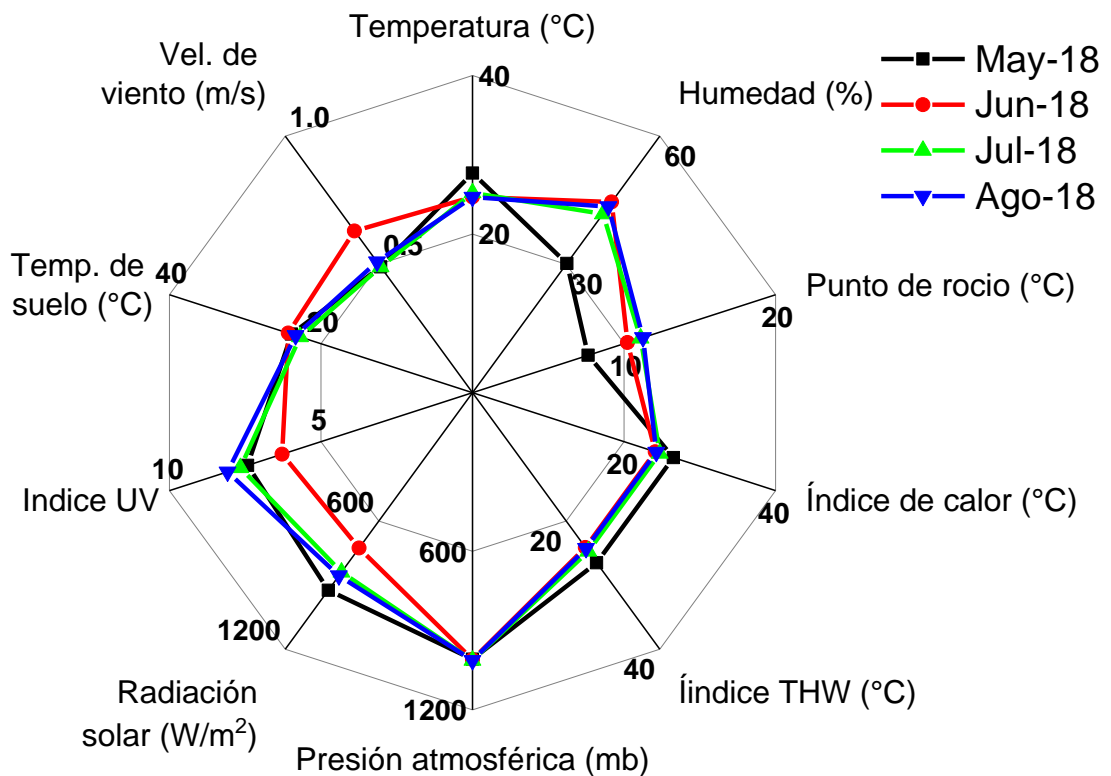


Figura 28 Datos climáticos obtenidos del observatorio geo electromagnético de la UNAM campus Juriquilla, en el periodo de mayo 2018 a agosto 2018.

En la Figura 29 se muestran los datos obtenidos del observatorio en el periodo de mayo 2019 a agosto 2019 el cual corresponde a las plantas tratadas con nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por sol gel acoplado a microondas, donde la

temperatura durante esos meses tuvo una variación de 25.8 a 26.9°C con una radiación solar entre los 724.4 a 1014 W/m² y un índice de radiación de 5.6 a 7.4.

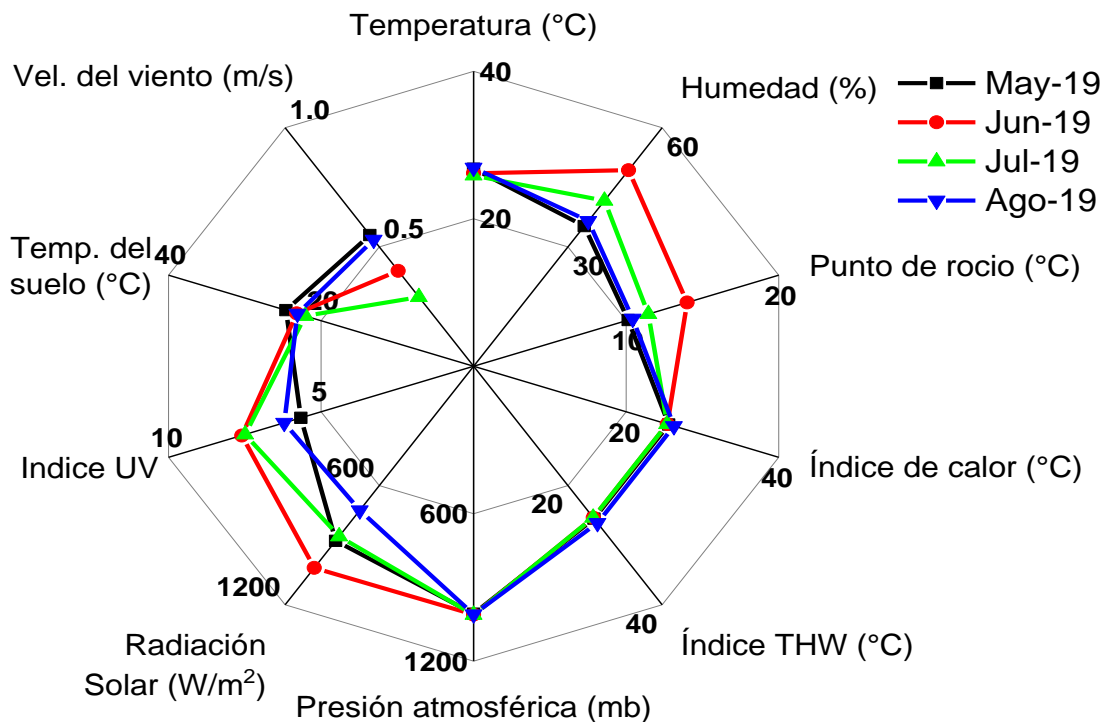


Figura 29 Datos climáticos del obtenidos del observatorio geo electromagnético de la UNAM campus Juriquilla, en el periodo de mayo 2019 a agosto 2019.

La temperatura y humedad interior del invernadero durante el periodo de desarrollo fue registrada manualmente con un higrómetro digital marca Ducame modelo HTC-1, la Tabla 9 muestra las temperaturas registradas cada mes obteniendo un promedio de 35.6 °C y 43.3% en humedad en el periodo de 2018, mientras que el periodo de 2019 registró una temperatura promedio de 35.92°C y una humedad promedio de 42.7 %.

Tabla 9. Temperatura y humedad registrada en el dentro del invernadero.

Periodo	Temperatura (°C)	Humedad (%)
Mayo 2018	36.4	45.1
Junio 2018	35.3	43.4
Julio 2018	35.6	42.3
Agosto 2018	35.4	42.5

Mayo 2019	35.7	39.9
Junio 2019	36.5	44.2
Julio 2019	36.2	43.5
Agosto 2019	35.3	43.2

6.5.2. Germinación y crecimiento

Como medio de comparación se registró el número de días desde que se insertaron las semillas hasta que éstas geminaron y desarrollaron la hoja verdadera como se puede observar en la Tabla 10 para nanopartículas sintetizadas por sol gel y la Tabla 11 para las nanopartículas acopladas a microondas, donde en ambos casos se aprecia que las



Figura 30 Hoja verdadera en plantas de alfalfa.

semillas de alfalfa germinan en el sustrato a los 5 días mientras que la hoja verdadera (Figura 30) se presenta a los 12 días de desarrollo, sin mostrar algún efecto claro en el tiempo de desarrollo al aumentar la concentración de nanopartículas.

Tabla 10. Tiempo de germinación y desarrollo de hoja verdadera para la alfalfa tratada con nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por el método sol gel.

Nanopartícula	Concentración (ppm)	Germinación (días)	Hoja verdadera (días)
Control	0	5	11
TiO_2	50	5	12
	100	5	12
	500	5	12
Ag-TiO_2	50	5	12
	100	5	12
	500	6	12
Cu-TiO_2	50	5	12
	100	5	12
	500	5	12
Fe-TiO_2	50	5	12

	100	5	12
	500	6	12

Tabla 11. Tiempo de germinación y desarrollo de hoja verdadera para la alfalfa tratada con nanopartículas de TiO₂ sintetizadas por el método sol gel acoplado a microondas.

Nanopartícula	Concentración (ppm)	Germinación (días)	Hoja verdadera (días)
Control	0	5	11
TiO ₂	50	5	11
	100	5	11
	500	5	11
Ag-TiO ₂	50	5	11
	100	5	11
	500	5	11
Cu-TiO ₂	50	5	11
	100	5	11
	500	5	11
Fe-TiO ₂	50	5	11
	100	5	11
	500	5	11

Una vez registrados estos datos se procedió a continuar con el tratamiento de los cultivos de alfalfa tratadas con nanopartículas sintetizadas por sol gel, añadiendo 50 ml de solución cada 3 días durante un periodo de 80 días para posteriormente retirar la mitad de la muestra para realizar las mediciones correspondientes y su medición de metabolitos secundarios, continuando con el tratamiento de la otra mitad de las muestras hasta completar los 120 días.

6.5.3. Deficiencia de nutrientes

Por medio de la observación de las hojas se pudo hacer una determinación de las condiciones de las plantas de alfalfa, cambio en su coloración o morfología son indicativos de múltiples deficiencias en las plantas, las deficiencias observadas se representan en la Figura 31 donde se muestra en la Figura 31a un ejemplo de hojas que no muestran deficiencia de algún micronutriente, la Figura 3 (b) presenta hojas con coloraciones purpuras siendo indicativos de deficiencia de boro, la Figura 31-c muestra cambio de tonalidad de verde claro

a amarillo siendo indicativo de la deficiencia de nitrógeno lo cual lleva la hoja a tomar tonos amarillos y morir, por último la Figura 31-d muestra puntos de coloración de color blanco-amarillo lo cual es indicativo de una deficiencia de potasio, las deficiencias observadas en cada concentración son resumidas en la Tabla 12.

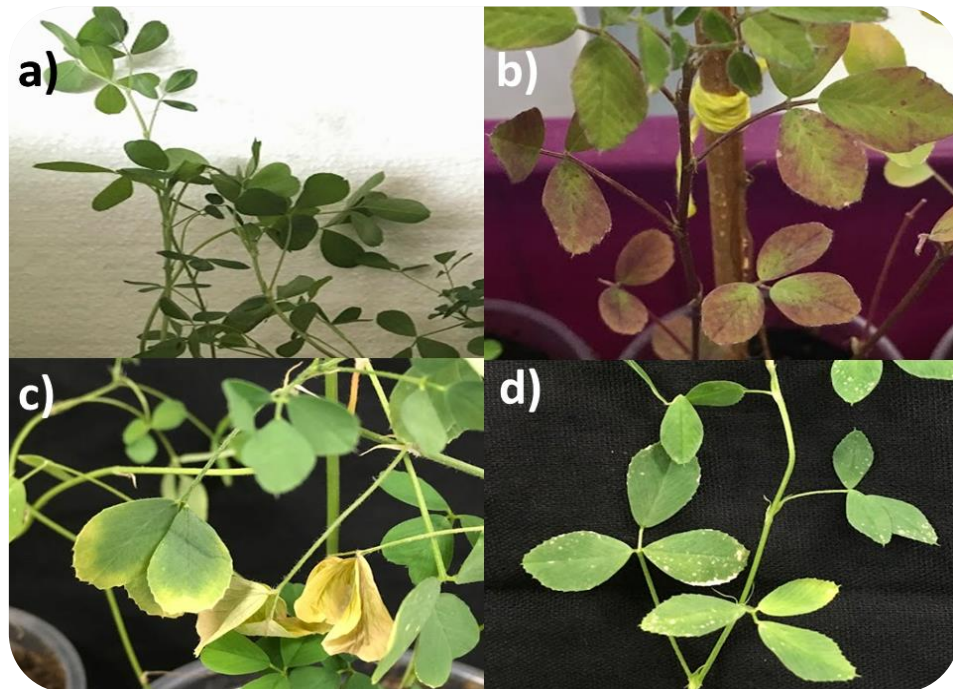


Figura 31 a) hojas saludables, b) hojas con deficiencia de boro (B), c) hojas con deficiencia de nitrógeno (N) y d) hojas con deficiencia de potasio (K).

Tabla 12. Deficiencias de nutrientes observadas en plantas tratadas con nanopartículas de dióxido de titanio en múltiples concentraciones

Nanopartículas	Concentración (ppm)	Deficiencia de micronutriente observada (número de plantas)
Control	0	Ninguna
TiO ₂	50	N y K
	100	N y K
	500	N y K
Ag-TiO ₂	50	B y N
	100	B y N
	500	N y K
Cu-TiO ₂	50	N y K

	100	N y K
	500	N y K
Fe-TiO ₂	50	N y K
	100	N y K
	500	N y K

6.5.4. Alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por método sol gel.

Los datos obtenidos sobre la morfología de la planta son descritos en esta sección donde en la Figura 32-a se pueden apreciar las mediciones obtenidas del largo (cm) en el tallo primario donde se puede observar una reducción en el tamaño para los 4 tipos de nanopartículas y las 3 concentraciones, en el caso de las 50 ppm se observa una disminución comparado con el control del 22% (TiO₂), 23% (Fe-TiO₂), 42% (Ag-TiO₂) y 8% (Cu-TiO₂), en las 100 ppm se registró el 31% (TiO₂), 26% (Fe-TiO₂), 27% (Ag-TiO₂) y 9% (Cu-TiO₂) de disminución, y por último las 500 ppm causó una disminución del 22% (TiO₂), 26% (Fe-TiO₂), 11% (Ag-TiO₂) y 17% (Cu-TiO₂), siendo la mayor disminución registrada con las nanopartículas dopadas con Ag a una concentración de 50 ppm.

En las medidas obtenidas del tallo secundario (Figura 32-b) también se aprecia una reducción de este, al regar con una concentración de 50 ppm se observa una disminución del 41% (TiO₂), 37% (Fe-TiO₂), 43% (Ag-TiO₂) y 34% (Cu-TiO₂), con una concentración de 100 ppm se registró el 55% (TiO₂), 44% (Fe-TiO₂), 23% (Ag-TiO₂) y 28% (Cu-TiO₂) de disminución, por último las 500 ppm causaron una disminución del 30% (TiO₂), 50% (Fe-TiO₂), 36% (Ag-TiO₂) y 25% (Cu-TiO₂).

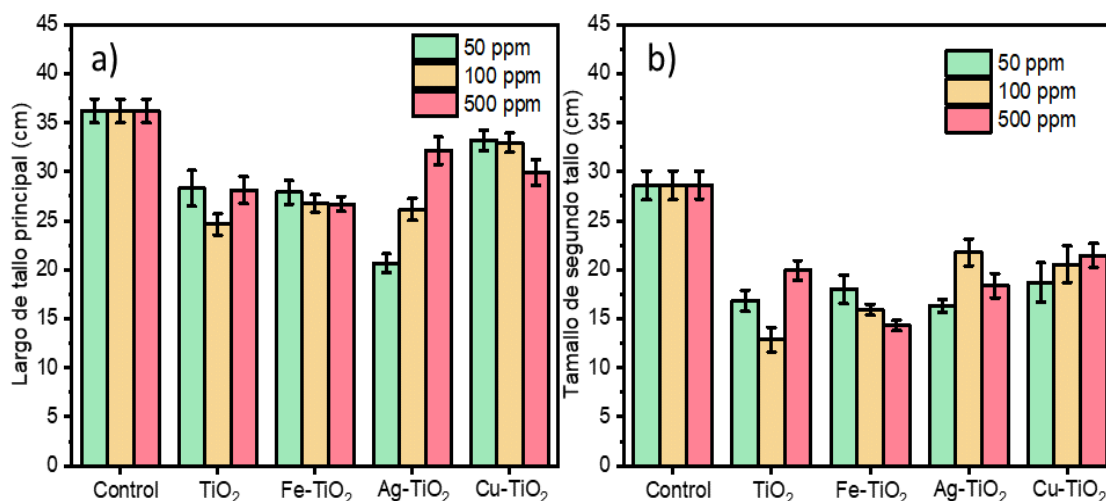


Figura 32 Largo de tallo a) principal y tallo b) secundario para plantas tratadas con nanopartículas de M-TiO₂ sol gel durante un periodo de 80 días.

La Figura 33-a muestra el largo de las hojas en el tallo principal de la alfalfa tratada con nanopartículas, donde se obtuvo una reducción del 7.7% (TiO₂), 18.4% (Fe-TiO₂), 6.8% (Ag-TiO₂) y un aumento (+) del 0.27% (Cu-TiO₂), en 100 ppm se aprecia una reducción del 4.8% (TiO₂), 25.5% (Fe-TiO₂), 11.9% (Ag-TiO₂), sin embargo a esta concentración hubo un aumento de tan solo el 2.7% para las nanopartículas de Cu-TiO₂, en el caso de las 500 ppm se obtuvo una reducción del 2.8% (TiO₂), 17.2% (Fe-TiO₂), 28.8% (Cu-TiO₂) y un aumento del 2.9% para el Ag-TiO₂.

En el caso de ancho de hoja en el tallo principal (Figura 33-b) hubo una reducción del 12.2% tan solo para el Fe-TiO₂, registrando aumentos del 12.7% (TiO₂), 4.2% (Ag-TiO₂) y 16.8% (Cu-TiO₂), con 100 ppm se obtuvo una reducción del 19% (Fe-TiO₂), 8.3% (Ag-TiO₂) y 0.52% (Cu-TiO₂) y un aumento del 12.9% para el TiO₂, en el caso de las 500 ppm se obtuvo una reducción del 19% (Fe-TiO₂), 8.37% (Ag-TiO₂) y 0.52% (Cu-TiO₂) y un aumento del 12.9% para el TiO₂.

Los largos de hoja en el tallo secundario como se aprecia en la Figura 33-c, se muestra también afectación en el tamaño con reducciones en las 50 ppm del 21.3% (TiO₂), 24.6% (Fe-TiO₂), 35.1% (Ag-TiO₂) y 25.6% (Cu-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 21.1% (TiO₂), 33% (Fe-TiO₂), 12.5%

(Ag-TiO₂) y 9.9% (Cu-TiO₂) y en el caso de las 500 ppm se obtuvo una reducción del 6.3% (TiO₂), 34.5% (Fe-TiO₂), 11.9% (Ag-TiO₂) y 26.5% (Cu-TiO₂).

Por último el ancho de hoja presentado en la Figura 33-d presenta una reducción para las 50 ppm del 9.6% (TiO₂), 19.3% (Fe-TiO₂), 14% (Ag-TiO₂) y 11.2% (Cu-TiO₂), para las 100 ppm se obtuvo una reducción del 21.4% (TiO₂), 25.8% (Fe-TiO₂), 18.4% (Ag-TiO₂) y 3.7% (Cu-TiO₂) y en el caso de las 500 ppm se obtuvo una reducción del 16.1% (Fe-TiO₂), 20.8% (Cu-TiO₂) y un aumento del 0.8% (Ag-TiO₂) y 0.4% (TiO₂).

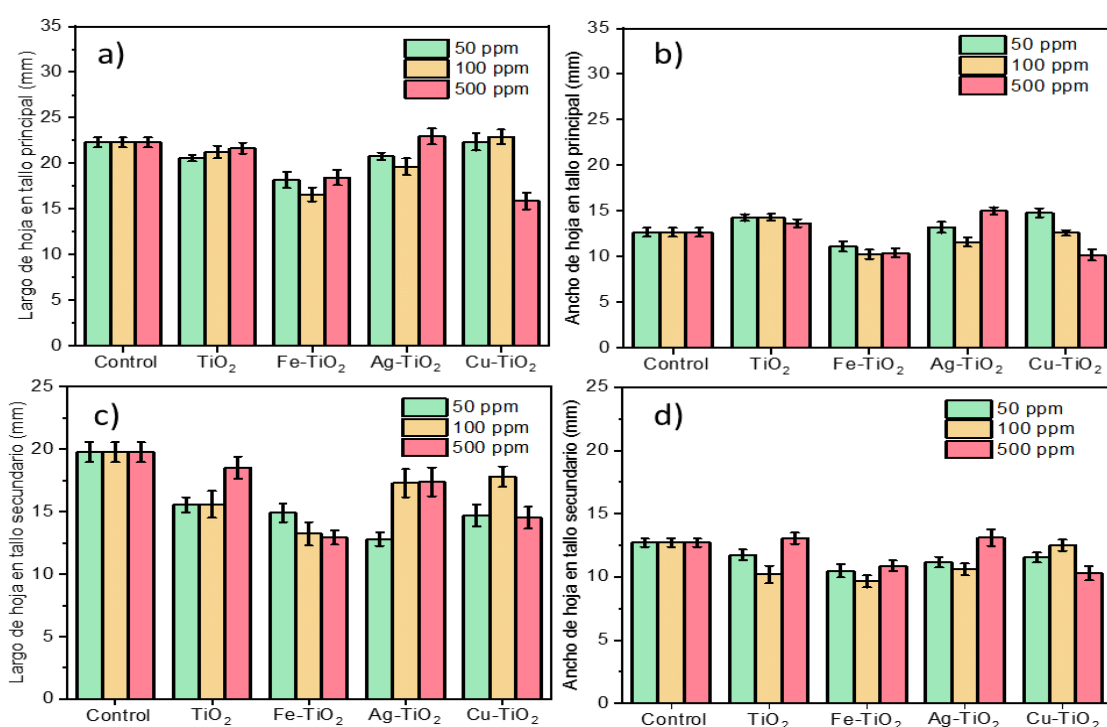


Figura 33 a) Largo y b) ancho de hoja en tallo principal, c) largo y d) ancho en tallo secundario para alfalfa tratada por 80 días con nanopartículas sintetizadas por sol gel.

Con fin de registrar un posible efecto toxicológico en los procesos fotosintéticos de la planta se hizo uso de un espectrofotómetro para medir la concentración de clorofila en la hojas, las mediciones obtenidas son presentadas en la Figura 34, donde se puede apreciar una reducción del 50 ppm del 32.5% (TiO₂), 16.9% (Fe-TiO₂), 12.9% (Ag-TiO₂) y 5.14% (Cu-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 40% (TiO₂), 27% (Fe-TiO₂), 8.7% (Ag-TiO₂) y +1.7% (Cu-TiO₂),

en el caso de las 500 ppm se obtuvo una reducción del 11.6% (TiO_2), 6.9% (Fe-TiO_2), 5.8% (Ag-TiO_2) y 15.3% (Cu-TiO_2).

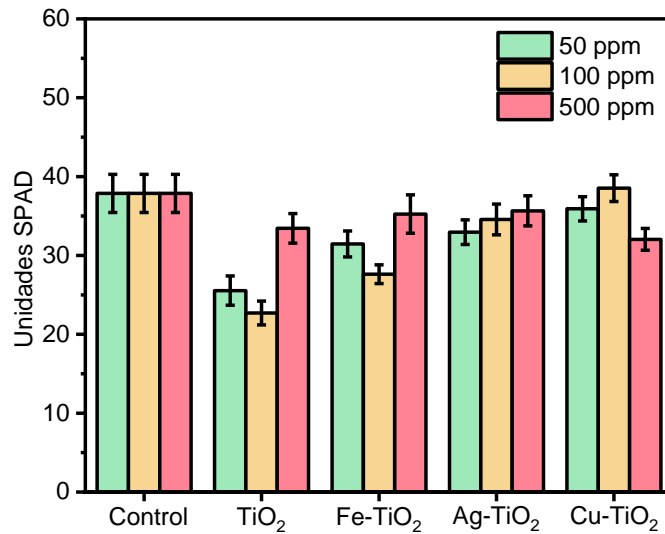


Figura 34 Concentración de clorofila medida en unidades SPAD para alfalfa tratada durante 80 días.

Pasando un periodo de 120 días se realizaron de nuevo las mediciones, donde en la Figura 35-a se muestran los resultados obtenidos sobre el largo de tallo principal donde se observa que persiste la reducción de tamaño con respecto a las plantas tratadas con nanopartículas, siendo en las 50 ppm una reducción del 35.4% (TiO_2), 34.2% (Fe-TiO_2), 33.6% (Ag-TiO_2) y 8.6% (Cu-TiO_2), en las 100 ppm el 30.2% (TiO_2), 25.6% (Fe-TiO_2), 28.9% (Ag-TiO_2) y 20.1% (Cu-TiO_2) de disminución, y por último las 500 ppm una disminución del 30.2% (TiO_2), 25.6% (Fe-TiO_2), 28.9% (Ag-TiO_2) y 20.1% (Cu-TiO_2).

En el caso del tallo secundario Figura 35-b también se aprecia una reducción de éste, al regar a una concentración de 50 ppm se observa una disminución del 40.5% (TiO_2), 41.4% (Fe-TiO_2), 38.3% (Ag-TiO_2) y 22.9% (Cu-TiO_2), en las 100 ppm se registró el 30.1% (TiO_2), 20.7% (Fe-TiO_2), 22.1% (Ag-TiO_2) y 29.9% (Cu-TiO_2) de disminución y en las 500 ppm se obtuvo 27.1% (TiO_2), 34.1% (Fe-TiO_2), 8.9% (Ag-TiO_2) y 10.8% (Cu-TiO_2), de disminución.

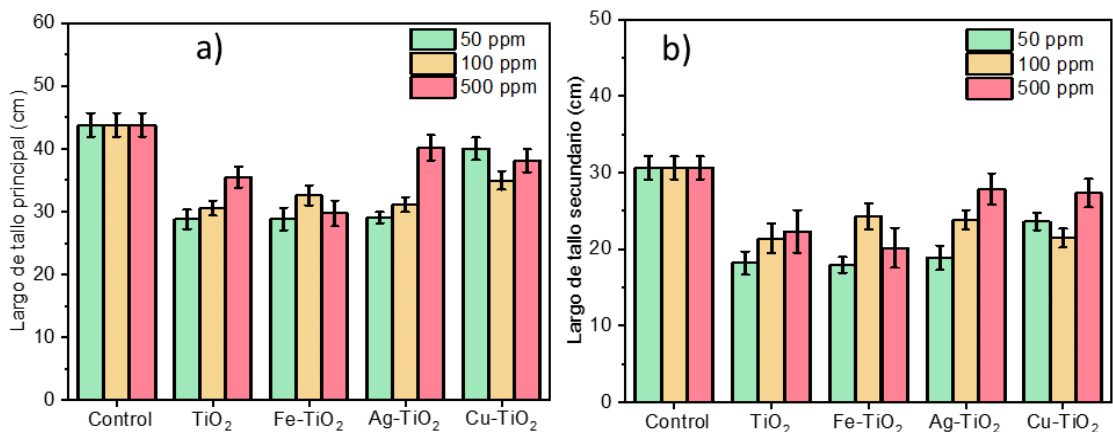


Figura 35 Largo de tallo principal a) y secundario b) para alfalfa tratada durante 120 días.

Con respecto al largo de hoja en el tallo principal (Figura 36-a) se aprecia una reducción del 29% (TiO₂), 31.5% (Fe-TiO₂), 26.4% (Ag-TiO₂) y 11% (Cu-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 40.1% (TiO₂), 6.8% (Fe-TiO₂), 6.9% (Ag-TiO₂) y 33.9% (Cu-TiO₂), y en 500 ppm hubo una reducción del 14.7% (TiO₂), 32.4% (Fe-TiO₂), 3.4% (Ag-TiO₂) y 26.4% (Cu-TiO₂).

En el caso de ancho de hoja en el tallo principal (Figura 36-b) se obtuvo una reducción del 23.8% (TiO₂), 19.1% (Fe-TiO₂), 23.4% (Ag-TiO₂) y 4.2% (Cu-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 32.6% (TiO₂), 23.2% (Ag-TiO₂), 14.83% (Cu-TiO₂), habiendo un aumento del 3% al tratar con Fe-TiO₂ a esta concentración, por ultimo las 500 ppm causaron una reducción del 5% (TiO₂), 18.3% (Fe-TiO₂), 22.3% (Cu-TiO₂) y un aumento del 2.3% para las plantas tratadas con Ag-TiO₂.

El largo de hoja en el tallo secundario (Figura 36-c) muestra una reducción para las 50 ppm del 14.1% (TiO₂), 14.2% (Fe-TiO₂), 17.3% (Ag-TiO₂) y 20.1% (Cu-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 19.4% (TiO₂), 5.1% (Fe-TiO₂), 1.3% (Ag-TiO₂) y 22.2% (Cu-TiO₂) y en las 500 ppm hubo reducciones del 33.4% (TiO₂), 18.6% (Fe-TiO₂), y 23.6% (Cu-TiO₂), sin embargo hubo un aumento del 11.6% para las plantas tratadas con Ag-TiO₂ a dicha concentración.

El ancho de hoja presentado en la (Figura 36-d) nuevamente presenta una reducción para las 50 ppm del 38.2% (TiO_2), 24.5% (Fe-TiO_2), 34.7% (Ag-TiO_2) y 20.4% (Cu-TiO_2), en 100 ppm se obtuvo una reducción del 43.1% (TiO_2), 5.3% (Fe-TiO_2), 27.5% (Ag-TiO_2) y 20.5% (Cu-TiO_2), y en 500 ppm se obtuvo una reducción del 31.2% (TiO_2), 25.8% (Fe-TiO_2), y 35.5% (Cu-TiO_2), habiendo un aumento de tan solo el 0.8% con el Ag-TiO_2 .

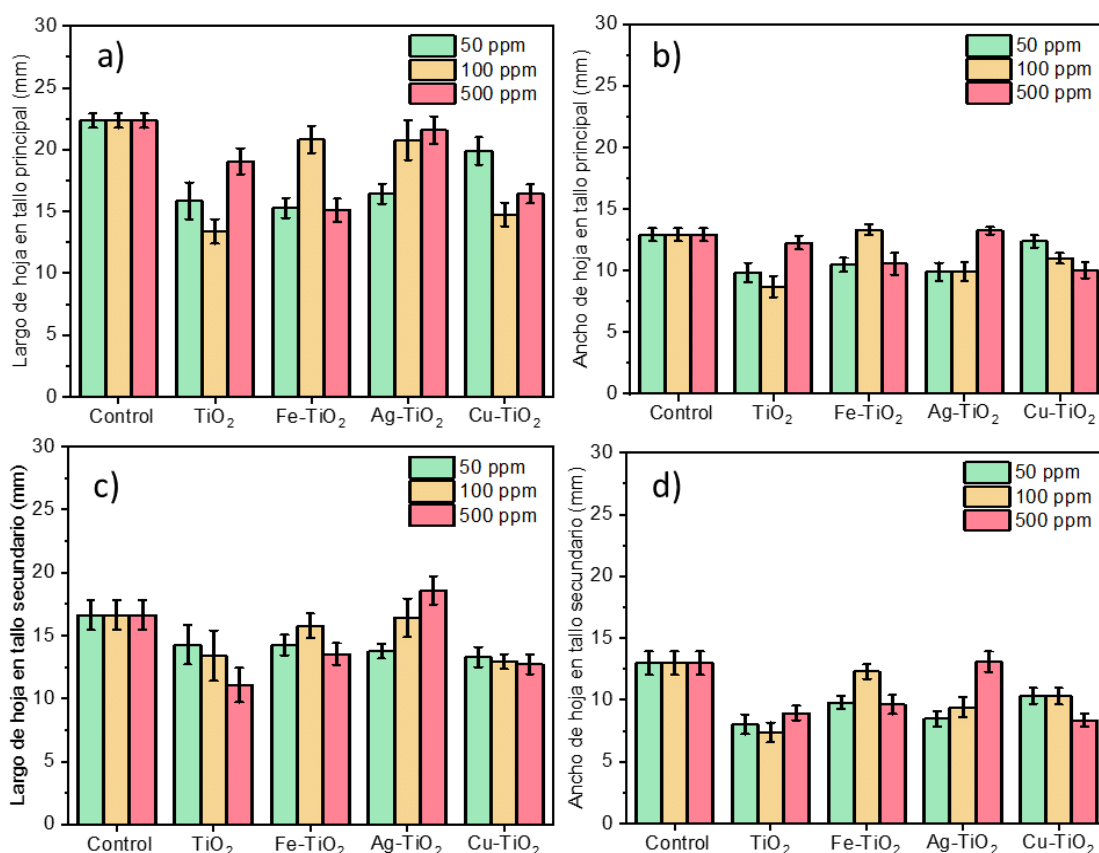


Figura 36 Largo a), y ancho b) de hojas presentes en tallo principal, largo c) y ancho d) de hojas presentes en tallo secundario para alfalfa tratada durante 120 días.

Nuevamente se midió el contenido de clorofila al cumplir un periodo de 120 días (Figura 37) donde se apreciar una reducción a las 50 ppm del 73.5% (TiO_2), 23.3% (Fe-TiO_2), 43% (Ag-TiO_2) y 47.2% (Cu-TiO_2), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 77% (TiO_2), 32% (Fe-TiO_2), 28.8% (Ag-TiO_2) y 59.1% (Cu-TiO_2), y en el caso de las 500 ppm se obtuvo una reducción del 71.9%

(TiO₂), 41.7% (Fe-TiO₂), 46.8% (Ag-TiO₂) y 41.1% (Cu-TiO₂), sin embargo no se puede determinar que la presencia de nanopartículas haya sido la causante de semejante disminución en especial en las plantas tratadas con TiO₂ sin dopar ya que aproximadamente a los 65 días de desarrollo los cultivos sufrieron ataques por parte fueron atacadas por una plaga de trips (Thysanoptera) los cuales causan un daño sustancial en la calidad de tejido de la planta durante su fase de larva.

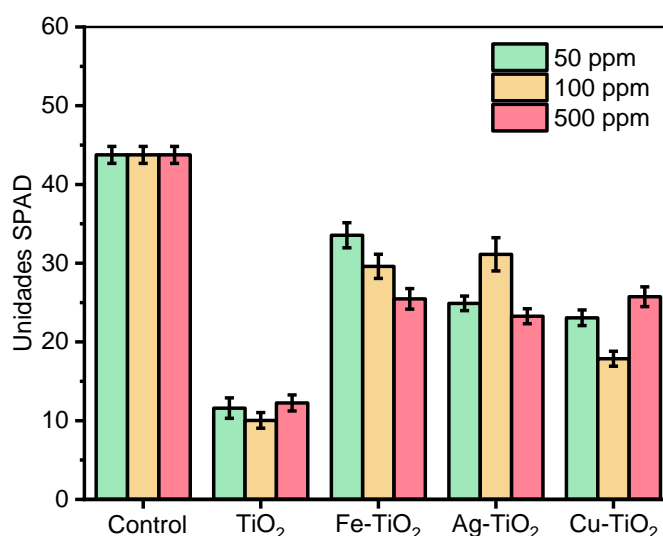


Figura 37 Medición de clorofila en unidades SPAD para alfalfa tratada durante 120 días.

6.5.4.1. Alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por el método sol gel acoplado a microondas

El efecto en el largo de tallo en alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por sol gel acoplado a microondas fue reportado a los 80 días de desarrollo donde en la Figura 38-a se muestran los datos obtenidos para el largo de tallo principal donde se puede observar en las 50 ppm una disminución comparado con el control del 21.9% (TiO₂), 16.7% (Fe-TiO₂), 9.9% (Ag-TiO₂) y 9.2% (Cu-TiO₂), en las 100 ppm se registró el 12.2% (TiO₂), 29.8% (Fe-TiO₂), 8.2% (Ag-TiO₂) y 30.6% (Cu-TiO₂) de disminución, y por ultimo las 500 ppm causó una disminución del 9.18% (TiO₂), 25.3% (Fe-TiO₂), 28.6% (Ag-TiO₂) y 16.9% (Cu-TiO₂).

Con respecto al tallo secundario (Figura 38-b) al regar con una concentración de 50 ppm se observa una disminución del 20.9% (TiO_2), 18.8% (Fe-TiO_2), 21.5% (Ag-TiO_2) y 11.4% (Cu-TiO_2), en las 100 ppm se registró el 17.6% (TiO_2), 17% (Fe-TiO_2), 31.3% (Ag-TiO_2) y 33.1% (Cu-TiO_2) de disminución y las 500 ppm causaron una disminución del 11.6% (TiO_2), 19.5% (Fe-TiO_2), 22.9% (Ag-TiO_2) y 25.2% (Cu-TiO_2).

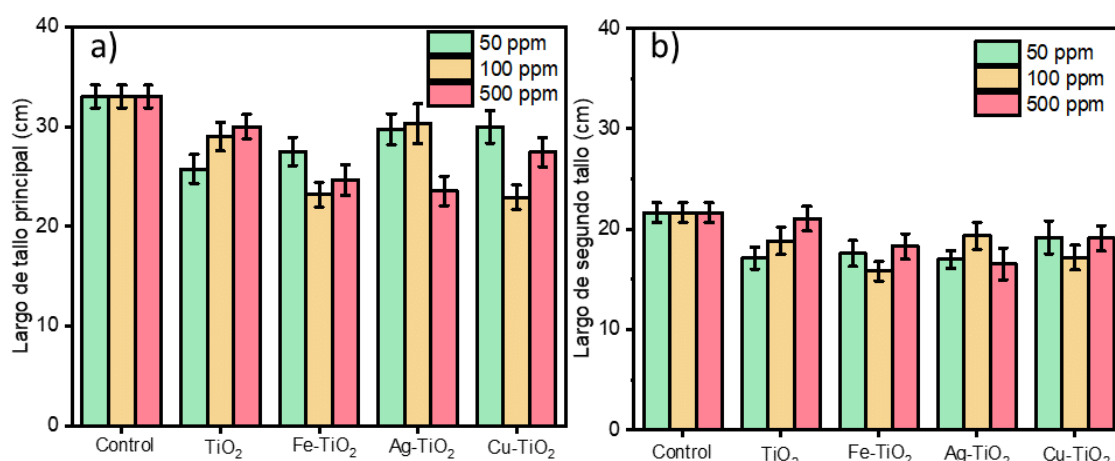


Figura 38 Largo de tallo principal a) y tallo secundario b) para alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por el método sol gel acoplado por microondas durante 80 días.

La Figura 39-a muestra el largo de las hojas en el tallo principal se aprecia una reducción del 7.7% (TiO_2), 18.4% (Fe-TiO_2), 6.8% (Ag-TiO_2) y un aumento del 0.27% (Cu-TiO_2) al ser tratadas a una concentración de 50 ppm, en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 4.8% (TiO_2), 25.5% (Fe-TiO_2), 11.9% (Ag-TiO_2) y un aumento del 2.7% (Cu-TiO_2), a las 500 ppm se obtuvo una reducción del 2.8% (TiO_2), 17.2% (Fe-TiO_2), 28.8% (Cu-TiO_2) y un aumento del +2.9% para el Ag-TiO_2 .

En el caso de ancho de hoja en el tallo principal (Figura 39-b) se aprecia una reducción del 12.2% (Fe-TiO_2), sin embargo las demás nanopartículas causaron un aumento del 2.9% (Ag-TiO_2), 4.2% (Ag-TiO_2) y 16.8% (Cu-TiO_2), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 19% (Fe-TiO_2), 8.3% (Ag-TiO_2), 0.52% (Cu-TiO_2) y un aumento del 12.9% (TiO_2), por último las 500 ppm

causaron una reducción del 19% (Fe-TiO₂), 8.37% (Ag-TiO₂) y 0.52% (Cu-TiO₂) y un aumento del 12.9% al ser tratadas con TiO₂.

El largo de hoja en el tallo secundario como se aprecia en la Figura 39-c se muestra una afectación obteniendo reducciones para las 50 ppm del 21.3% (TiO₂), 24.6% (Fe-TiO₂), 35.1% (Ag-TiO₂) y 25.6% (Cu-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 21.1% (TiO₂), 33% (Fe-TiO₂), 12.5% (Ag-TiO₂) y 9.9% (Cu-TiO₂), en el caso de las 500 ppm se obtuvo una reducción del 6.3% (TiO₂), 34.5% (Fe-TiO₂), 11.9% (Ag-TiO₂) y 26.5% (Cu-TiO₂).

Por último el ancho de hoja presentado en la Figura 39-d presenta una reducción en las 50 ppm del 9.6% (TiO₂), 19.3% (Fe-TiO₂), 14% (Ag-TiO₂) y 11.2% (Cu-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 21.4% (TiO₂), 25.8% (Fe-TiO₂), 18.4% (Ag-TiO₂) y 3.7% (Cu-TiO₂) y en las 500 ppm se obtuvo una reducción del 16.1% (Fe-TiO₂), +0.8% (Ag-TiO₂) y 20.8% (Cu-TiO₂), habiendo tan solo un aumento del 0.4% al ser tratadas con TiO₂.

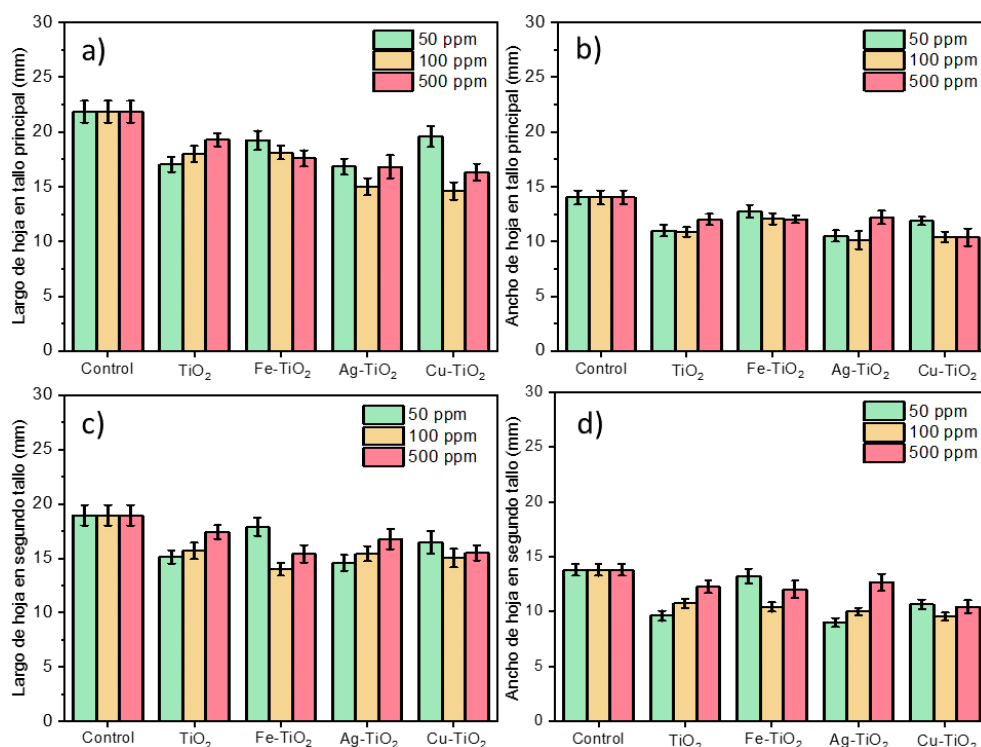


Figura 39 Largo a) y ancho b) de hoja en tallo principal y largo c) y ancho d) en tallo secundario para alfalfa tratada por nanopartículas sintetizadas por sol gel acoplado por microondas durante 80 días.

Igualmente se cuantifico el contenido de clorofila donde se puede apreciar una reducción del 31.5% (Fe-TiO₂), y 7.67% (Cu-TiO₂) al ser tratadas a una concentración de 50 ppm, sin embargo se observa a dicha concentración un aumento del 7.43% (TiO₂) y 14.2% (Ag-TiO₂), en el caso de las 100 ppm se obtuvo una reducción del 14.2% (TiO₂), 16.2% (Fe-TiO₂), 15.5% (Ag-TiO₂) y 24.8% (Cu-TiO₂), y al ser tratadas con una concentración de 500 ppm se obtuvo una reducción del 25.2% (TiO₂), 13.2% (Fe-TiO₂), 15.3% (Ag-TiO₂) y 30.1% (Cu-TiO₂).

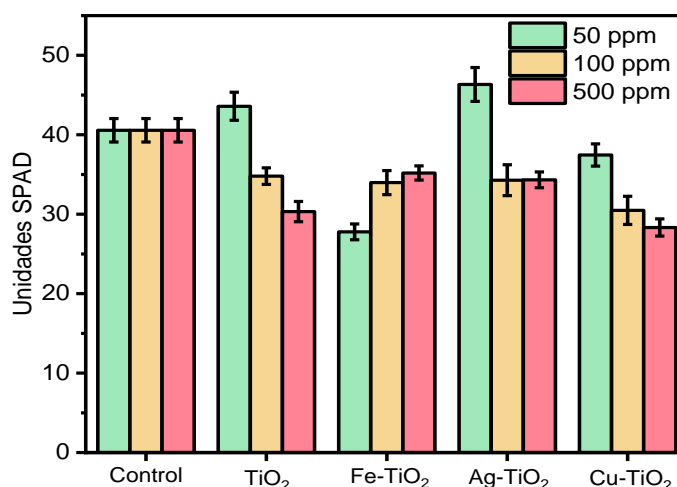


Figura 40 Concentración de clorofila en unidades SPAD, para alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por sol gel acoplado por microondas durante 80 días.

6.5.5. Cuantificación de metabolitos secundarios

Antes de realizar las mediciones de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante se prepararon las curvas de calibración, la Tabla 13 y Figura 41 muestran los datos obtenidos para diversas concentraciones de ácido gálico y sus respectivas absorbancias, obteniendo una recta con una R cuadrada de 0.998 el cual corresponde a un buen ajuste lineal que puede ser usado para las mediciones de las muestras de ácido gálico.

Tabla 13. Concentraciones y absorbancias de distintas concentraiones de ácido gálico

Concentración	Absorbancia
20	0.0435
40	0.0933
60	0.1389
80	0.1875
100	0.2240
120	0.2820
140	0.3157
160	0.3710

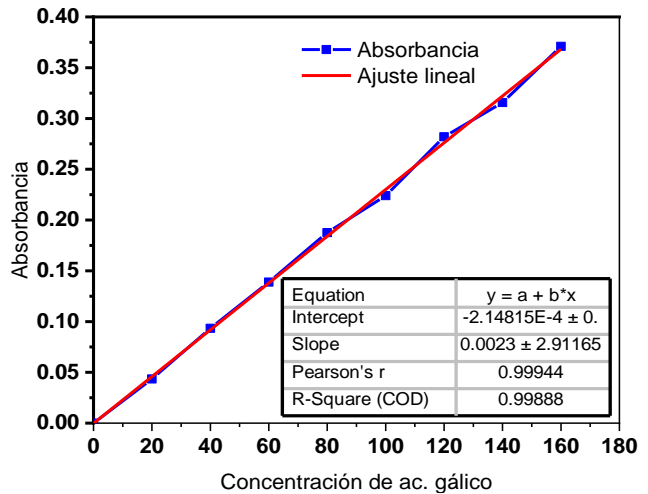


Figura 41 Ajuste lineal de la recta de concentración de ácido gálico.

La Tabla 14 y la Figura 42 muestran los datos obtenidos de concentración y ajuste lineal para la curva de calibración de concentración de rutina para la medición de flavonoides, obteniendo una R cuadrada de 0.999 siendo adecuada para usar en la determinación de flavonoides.

Tabla 14 Concentración y absorbancia de rutina.

Concentración	Absorbancia
0	0
2	0.0073
5	0.0155
10	0.0314
25	0.0738
50	0.1642
100	0.3539
150	0.5415
200	0.705

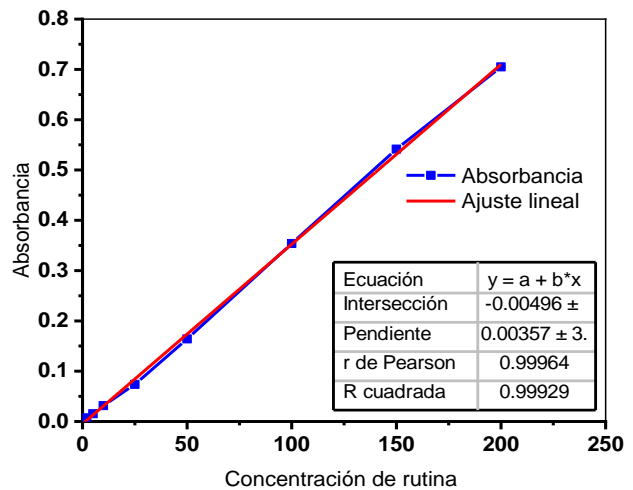


Figura 42 Ajuste lineal de la recta de concentración de rutina.

La Tabla 15 y la Figura 43 muestra los datos y curva de calibración obtenida para la absorbancia y concentración de Trolox usado para medir la capacidad

antioxidante y el porcentaje de inhibición, donde se obtiene una R^2 de 0.994 teniendo un valor indicado para la medición de la capacidad oxidante en las muestras de alfalfa.

Tabla 15. Concentración y absorbancia de trolox.

Concentración trolox	Absorbancia
0	0.8543
50	0.7743
100	0.7555
200	0.6729
300	0.6012
400	0.5186
500	0.4572
600	0.3465
700	0.2836
800	0.1586

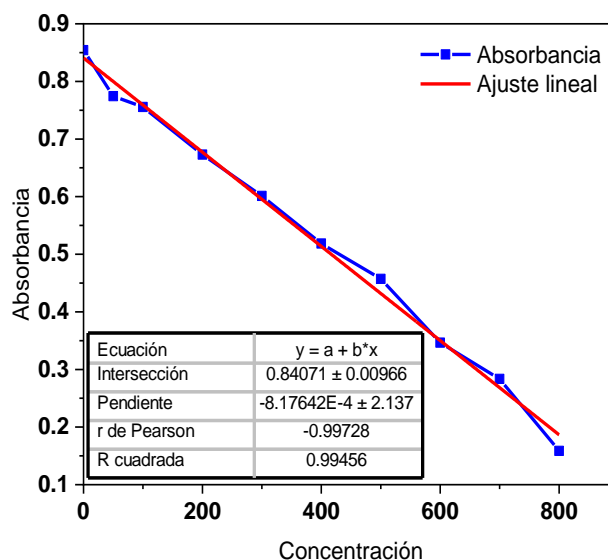


Figura 43 Curva de calibración de la capacidad antioxidante.

6.5.5.1. Metabolitos secundarios en alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por medio de sol gel

La cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y % de inhibición de DPPH fue medido en hojas, tallo y raíces de la planta de alfalfa. Las mediciones obtenidas para las hojas de plantas tratadas con dióxido de titanio sin dopar (Figura 49-a) sintetizado por medio de sol gel y tratadas durante un periodo de 80 días presentan un aumento en los fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico/g de muestra orgánica con respecto al control del 17.88% (50 ppm), 59.48% (100 ppm) y 35.73% (500 ppm), la concentración total de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina/g de muestra orgánica tuvo un aumento del 2.68% (50ppm), 16.47% (100 ppm) y 13.35% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH fue registrado en 46.28% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (40.80%).

Las hojas en plantas tratadas con Cu-TiO₂ (Figura 44-b) presentan un aumento en la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico/g de muestra orgánica del 19.84% (50 ppm), 27.97% (100 ppm) y 8.57% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina/g de muestra orgánica tuvo un aumento del 7.35% (50ppm), 30.26% (100 ppm) y 32.59% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 38.19% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (34.98%).

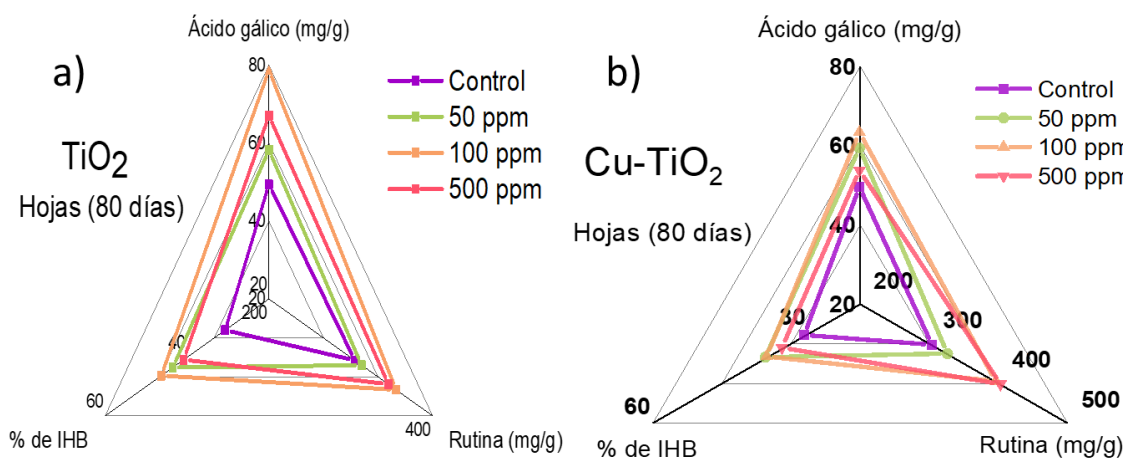


Figura 44 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en las hojas de la alfalfa tratada con a)TiO₂, b)Ag-TiO₂, durante 80 días.

La Figura 45-a muestra los resultados obtenido bajo el tratamiento de Ag-TiO₂, donde se muestra una aumento de los fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico/g de muestra orgánica en un 31.11% (50 ppm), 20.20% (100 ppm) y 8.46% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina/g de muestra orgánica tuvo un aumento del 39.91% (50ppm), 68.03% (100 ppm) y 8.18% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 43.96% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (32.67%).

La Figura 45-b muestra los resultados obtenido bajo el tratamiento de Fe-TiO₂, donde se muestra una aumento de fenoles totales expresados en mg

equivalentes de ac. gálico/g de muestra orgánica en las hojas en un 25.55% (50 ppm), 1.23% (100 ppm) y 19.51% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 39.05% (50ppm), 26.02% (100 ppm) y 28.99% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 39.86% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (27.40%).

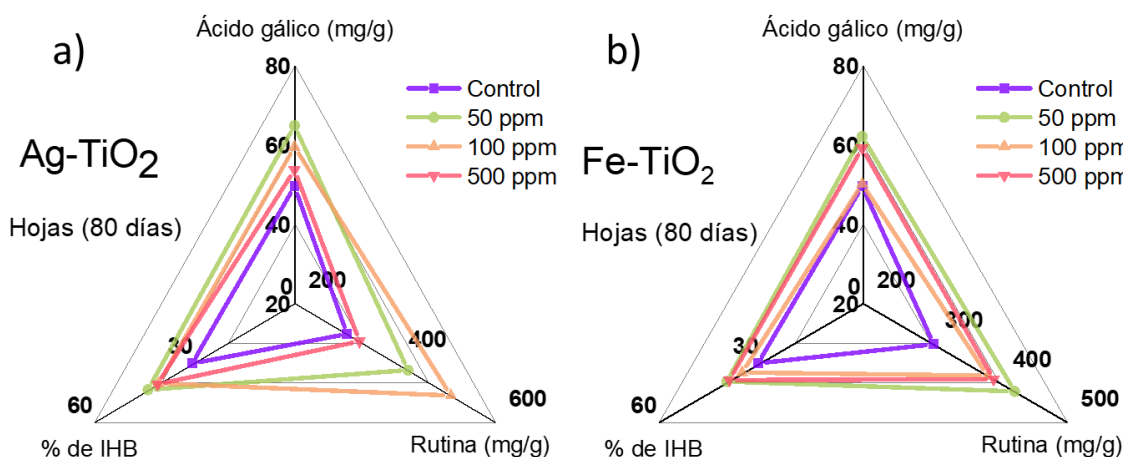


Figura 45 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en las hojas de la alfalfa tratada con a) Fe-TiO₂, b) Cu-TiO₂, durante 80 días.

La Figura 46-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de TiO₂ en tallos donde se muestra un aumento de los fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en el tallo en un 38.32% (50 ppm), 129.65% (100 ppm) y 37.71% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina en la muestra tuvo un aumento del 16.20% (50ppm), 44.26% (100 ppm) y 23.01% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 43.76% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 ppm (37.67%).

La Figura 46-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Cu-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en el tallo en un 41.36% (50 ppm), 69.20% (100 ppm) y 51.59%

(500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 17.56% (50ppm), 13.35% (100 ppm) y 23.97% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 33.68% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (28.33%).

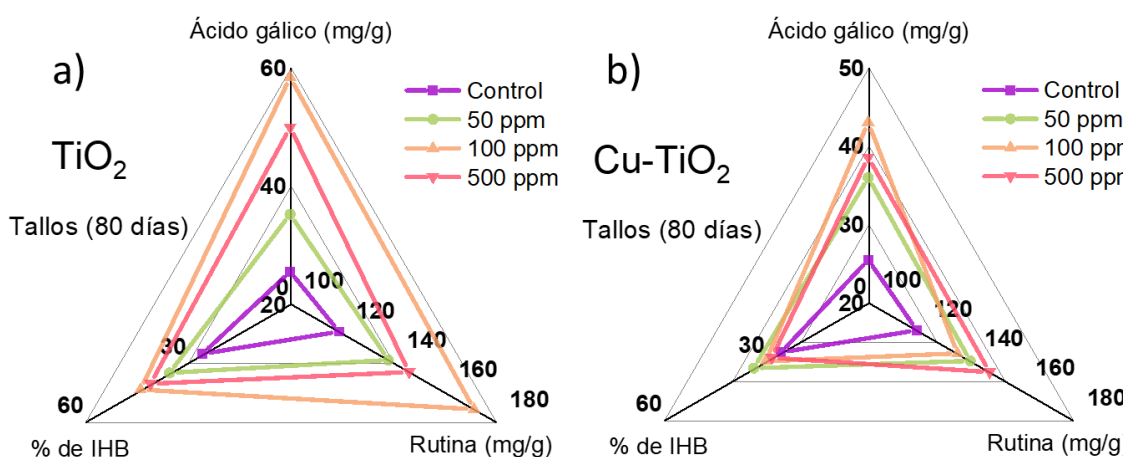


Figura 46 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) TiO₂, b) Ag-TiO₂, durante 80 días.

La Figura 47-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Ag-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en el tallo en un 17.78% (50 ppm), 73.10% (100 ppm) y 37.71% (500 ppm), la concentración total de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 5.48% (50ppm), 39.32% (100 ppm) y 20.33% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 43.76% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (40.84%).

La Figura 47-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Fe-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en los tallos en un 23.73% (50 ppm), 36.89% (100 ppm) y 48% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 34.59% (50ppm), 19.73% (100 ppm)

y 38.95% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 32.21% para las 500 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (28.01%).

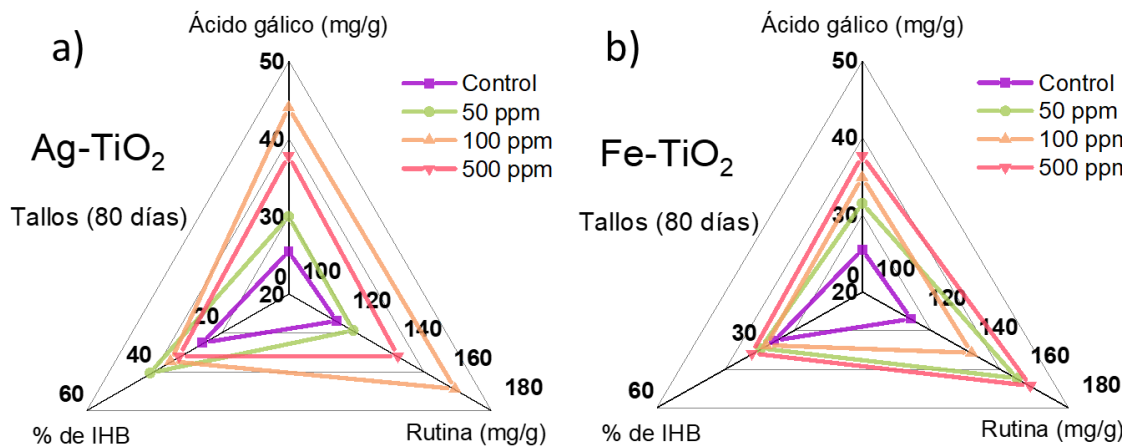


Figura 47 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) Fe-TiO₂, b) Cu-TiO₂, durante 80 días.

La Figura 48-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de TiO₂ en tallos donde se muestra un aumento de los fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las raíces en un 71.24% (50 ppm), 61.01% (100 ppm) y 50.88% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina en la muestra tuvo un aumento del 42.43% (50ppm), 85.51% (100 ppm) y 87% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 22.60% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 ppm (19.04%).

La Figura 48-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Cu-TiO₂, donde se muestra un aumento de los fenoles totales en las raíces en un 17.23% (50 ppm), 53.64% (100 ppm) y 61.63% (500 ppm), la concentración de flavonoides totales tuvo un aumento del 36.66% (50ppm), 59.91% (100 ppm) y 76.41% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 21.89% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (15.58%).

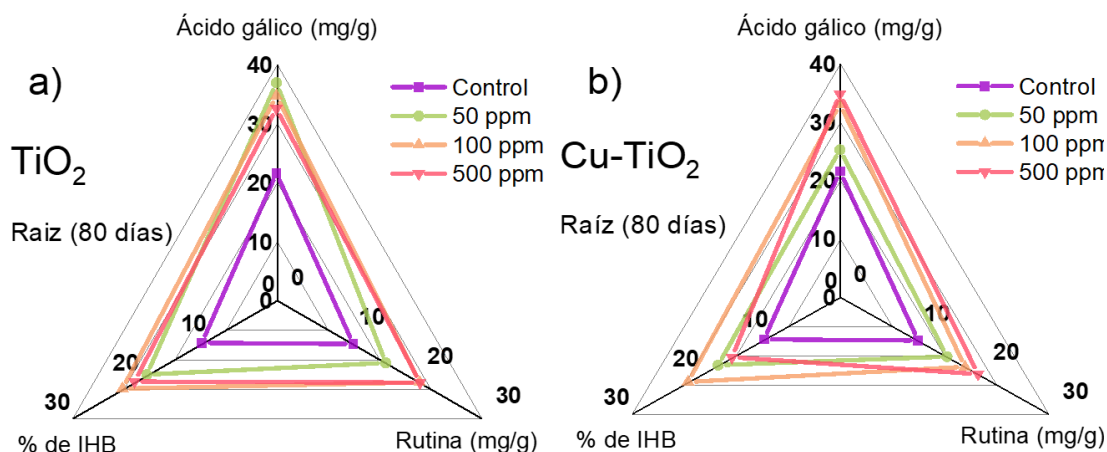


Figura 48 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en raíz de alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 80 días.

La Figura 49-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Ag-TiO_2 , donde se muestra un aumento de los fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las raíces en un 22.64% (50 ppm), 60.49% (100 ppm) y 14.20% (500 ppm), la concentración total de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 39.61% (50 ppm), 86.40% (100 ppm) y 3.44% (500 ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 17.13% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 ppm (13.84%).

La Figura 49-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Fe-TiO_2 , donde se muestra un aumento de los fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las raíces en un 67.00% (50 ppm), 73.93% (100 ppm) y 63.27% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 78.74% (50 ppm), 91.46% (100 ppm) y 74.22% (500 ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 21.38% para las 500 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 ppm (14.88%).

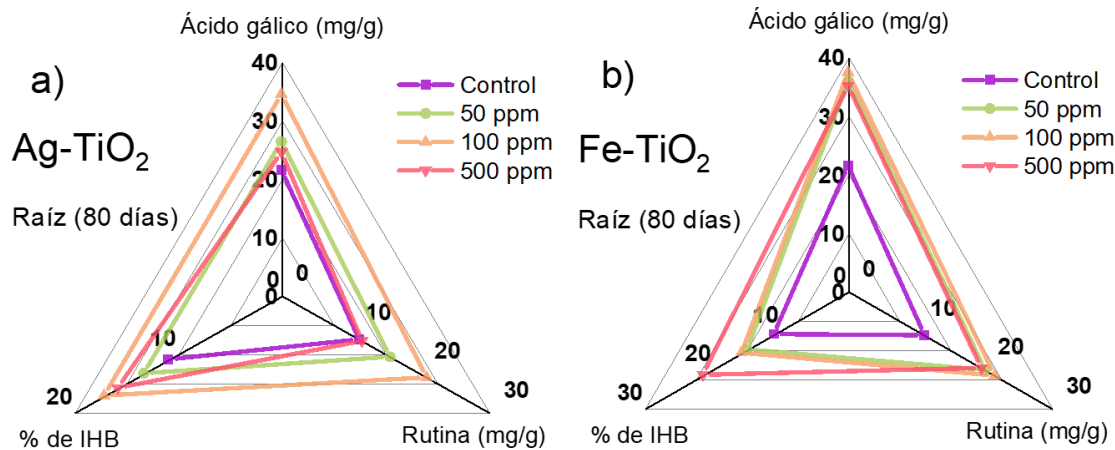


Figura 49 ráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en raíz de alfalfa tratada con a) Fe-TiO₂, b) Cu-TiO₂, durante 80 días.

Después del tratamiento durante 80 días parte de las muestras fueron conservadas para un tratamiento de 120 días donde en la Figura 50-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las hojas en un 46% (50 ppm), 32.58% (100 ppm) y 46.9% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 16.36% (50ppm), 11.66% (100 ppm) y 14.51% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 50.1% para las 500 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (43.68 %).

La Figura 50-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Ag-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las hojas en un 32.18% (50 ppm), una reducción del 2.01% (100 ppm) y un aumento del 12.10% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 35.55% (50ppm), una reducción del 13.09% (100 ppm) y una del reducción del 10.98% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 46.06% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (36.58%).

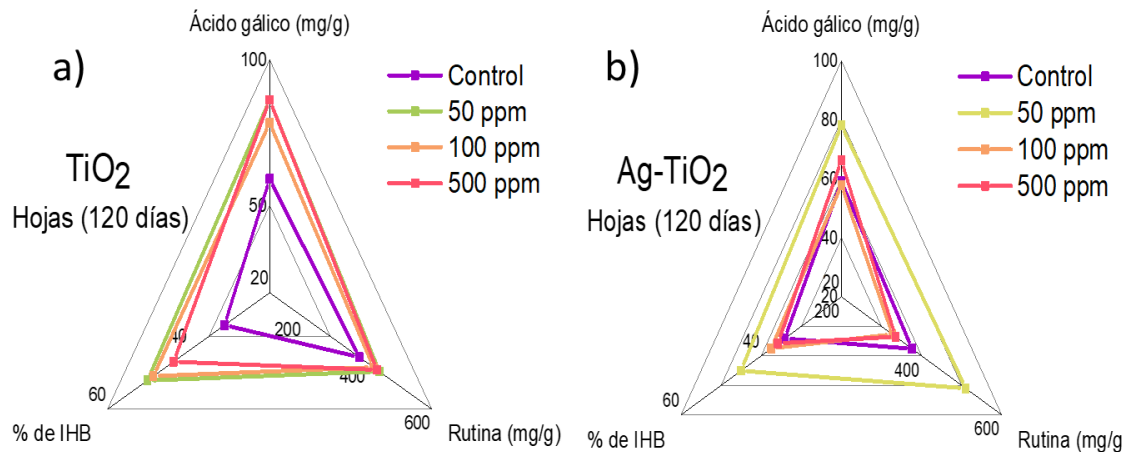


Figura 50 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en hojas de alfalfa tratada con a) TiO_2 , b) Ag-TiO_2 , durante 120 días.

La Figura 51-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Fe-TiO_2 , donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las hojas en un 14.39% (50 ppm), 11.47% (100 ppm) y 0.92% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 16.16% (50 ppm), 25.20% (100 ppm) y 7.80% (500 ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 46.79% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (36.58%). Las muestras correspondientes al tratamiento con Cu-TiO_2 , no pudieron ser registradas debido a que las muestras de alfalfa no sobrevivieron durante ese periodo de tratamiento.

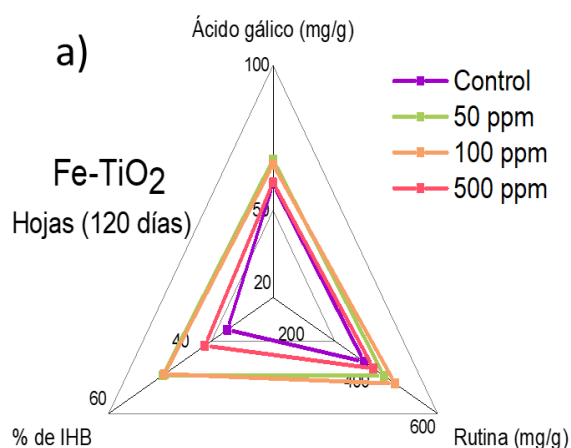


Figura 51 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en hojas de alfalfa tratada con a) Fe-TiO₂ durante 120 días.

En la Figura 52-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en el tallo en un 71.25% (50 ppm), 39.28% (100 ppm) y 22.20% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo una disminución del 7.45% (50 ppm), un aumento del 6.27% (100 ppm) y un aumento del 10.53% (500 ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 48.09% para las 500 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (40.38 %).

La Figura 52-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Ag-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en un 53.68% (50 ppm), una reducción del 42.76% (100 ppm) y un aumento del 49.48% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 49.88% (50 ppm), una reducción del 5.39% (100 ppm) y un aumento del 56.12% (500 ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 36.60% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (32.94%).

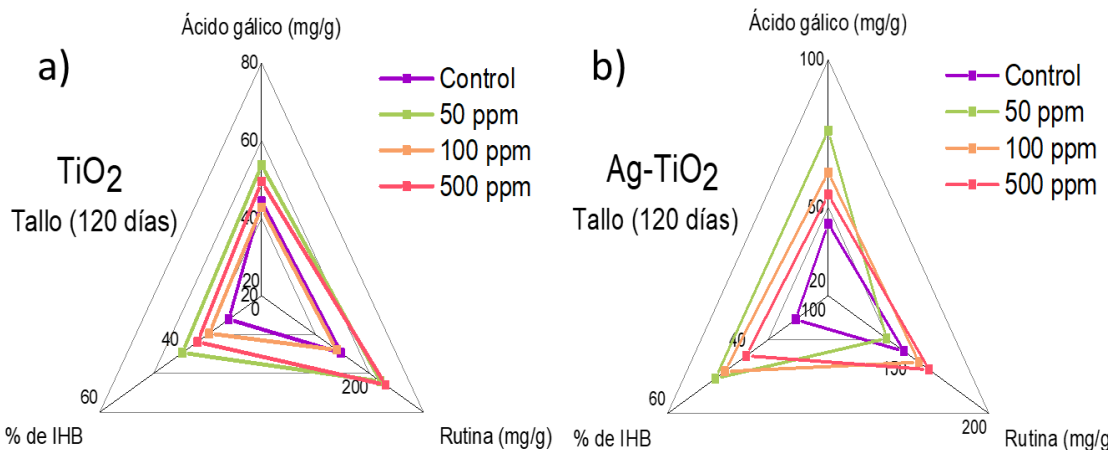


Figura 52 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallos de alfalfa tratada con a) TiO₂, b) Ag-TiO₂, durante 120 días.

La Figura 53-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Fe-TiO₂, donde se muestra un aumento de los fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico en el tallo en un 3.19% (50 ppm), un aumento del 10.28% (100 ppm) y 4.96% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 1.34% (50 ppm), 9.13% (100 ppm) y 2.38% (500 ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 38.37% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 ppm (33.58%).

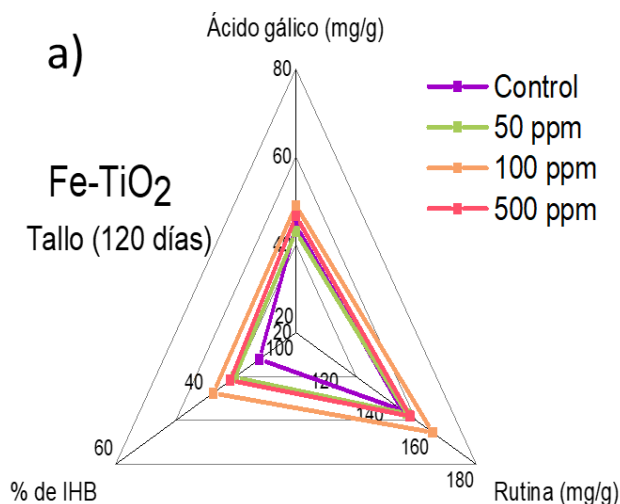


Figura 53 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) Fe-TiO₂, durante 120 días.

En la Figura 54-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las raíces en un 69.98% (50 ppm), 77.72% (100 ppm) y 87.91% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 62.61% (50 ppm), 49.22% (100 ppm) y 66.21% (500 ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 31.32% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (27.13%).

La Figura 54-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Ag-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las raíces en un 76.13% (50 ppm), 23.03% (100 ppm) y un aumento del 41.36% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 62.61% (50 ppm), 23.37% (100 ppm) y 26.71% (500 ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 31.17% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 ppm (27.41%).

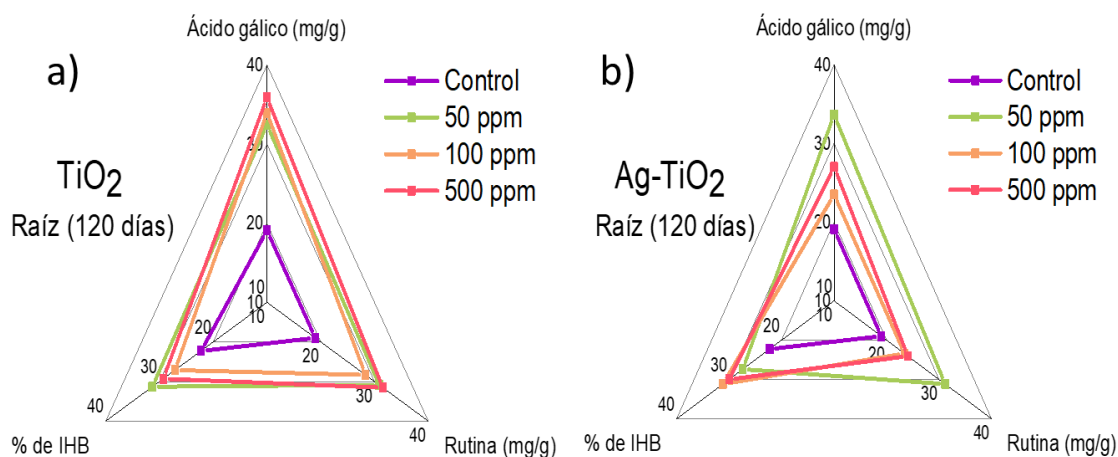


Figura 54 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en raíz de alfalfa tratada con a) TiO₂, b) Ag-TiO₂, durante 120 días.

La Figura 55-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Fe-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico en las hojas en un 51.47% (50 ppm), 44.87% (100 ppm) y 31.02% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 21.89% (50ppm), 1.54% (100 ppm) y 3.4942% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 28.52% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 ppm (25.56%).

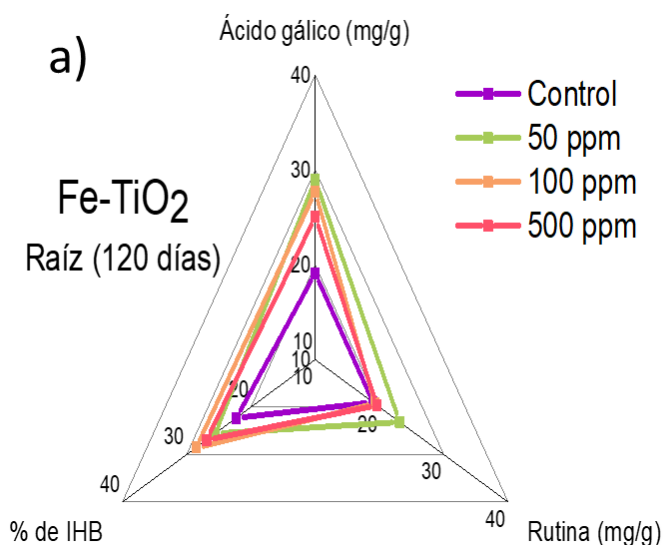


Figura 55 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en tallo de alfalfa tratada con a) Fe-TiO₂ durante 120 días.

6.5.5.2. Metabolitos secundarios en alfalfa tratada con nanopartículas sintetizadas por medio de sol gel acoplado a microondas

Las mediciones obtenidas para las hojas de plantas tratadas con dióxido de titanio sin dopar (Figura 56-a) presentan un aumento en fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico con respecto al control del 32.7% (50 ppm), 47.7% (100 ppm) y 51.9% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 36.2% (50ppm), 21.4% (100 ppm) y 39.9% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH fue registrado en 55.5% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (46.6%).

Las hojas en plantas tratadas con Cu-TiO₂ (Figura 56-b) presentan un aumento en la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico del 31.1% (50 ppm), 59.4% (100 ppm) y 43.6% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 36.3% (50ppm), 34.8% (100 ppm) y 27.1% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 55.9% para las 50 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (46.7%).

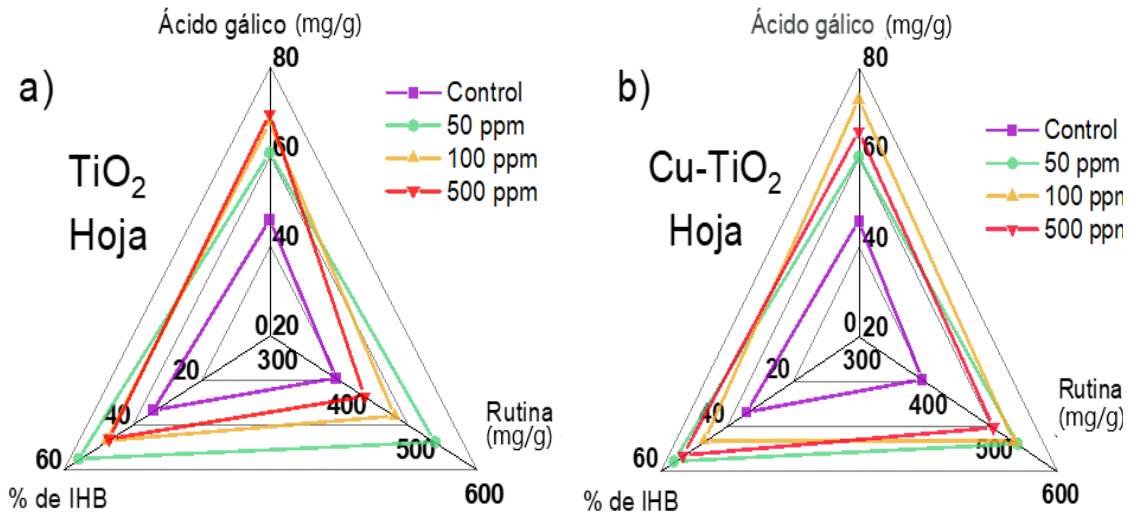


Figura 56 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en las hojas de la alfalfa tratada con a)TiO₂, b)Cu-TiO₂.

La Figura 57-a muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Ag-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico 40.1% (50 ppm), 28.6% (100 ppm) y 27.5% (500 ppm), la concentración total de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 1% (50ppm), 27.3% (100 ppm) y 11.4% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 54.1% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (47.6%).

La Figura 57-b muestra los resultados obtenidos bajo el tratamiento de Fe-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico en las hojas en un 30.8% (50 ppm), 43.9% (100 ppm) y 61.5% (500 ppm), la concentración flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina totales tuvo un aumento del 33.5% (50ppm), 44.9% (100 ppm) y 73.6% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición de radical de DPPH fue registrado en 46.5% para las 500 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (43.7%).

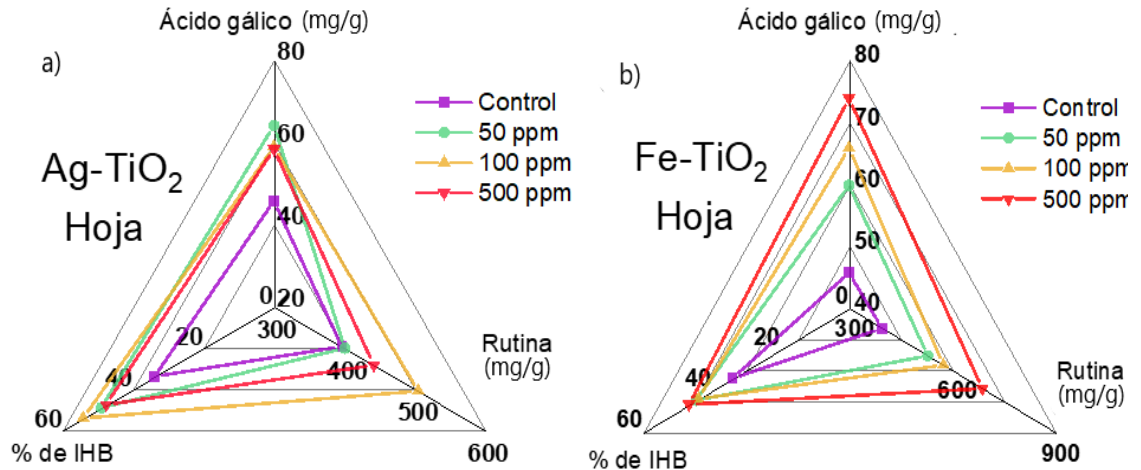


Figura 57 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en hojas de la alfalfa tratada con a) Ag-TiO₂ y b) Fe-TiO₂.

Las mediciones obtenidas para el tallo de las plantas tratadas con dióxido de titanio sin dopar (Figura 58-a) presentan un aumento en la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico con respecto al control del 38% (50 ppm), 86% (100 ppm) y 31.8% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 11.2% (50ppm), 23.1% (100 ppm) y 6.1% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 37.7% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (34%).

El tallo en plantas tratadas con Cu-TiO₂ (Figura 58-b) presenta un aumento en la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico del 58.4% (50 ppm), 40% (100 ppm) y 125% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 8% (50ppm), 24.3% (100 ppm) y 32.4% (500ppm), el porcentaje de inhibición mayor fue registrado en 47.2% para las 500 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (31.9%).

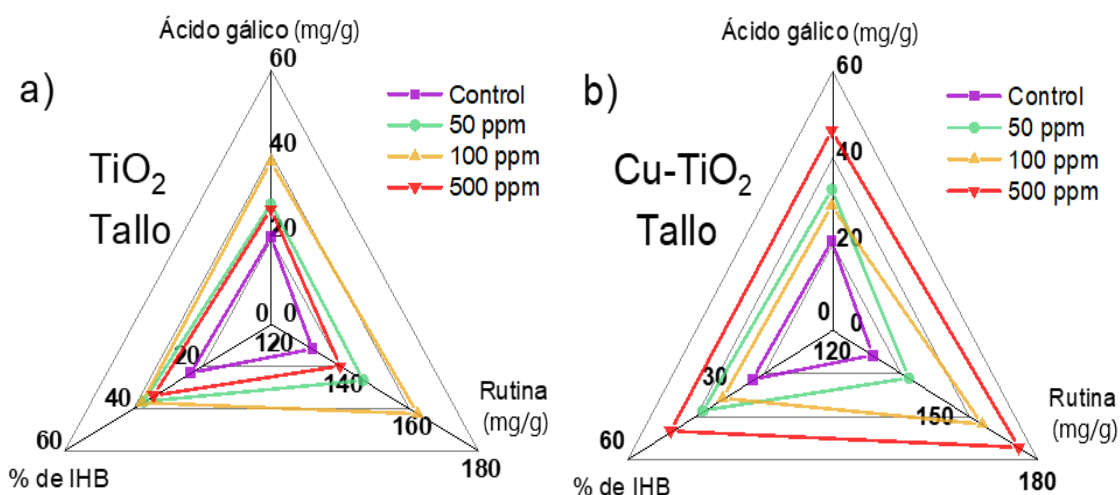


Figura 58 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en el tallo de la alfalfa tratada con a) TiO_2 y b) Cu-TiO_2 .

La Figura 59-a muestra los resultados obtenidos en el tallo bajo el tratamiento de Ag-TiO_2 , donde se muestra un aumento del contenido de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico en las hojas en un 20% (50 ppm), 37.1% (100 ppm) y 46.5% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 20.1% (50ppm), 33.3% (100 ppm) y 30.9% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición de DPPH fue registrado en 44.3% para las 100 ppm mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 50 y 500 ppm siendo un porcentaje de inhibición del 42%.

La Figura 59-b corresponde a las mediciones en el tallo bajo el tratamiento de Fe-TiO_2 , donde se muestra un aumento del contenido de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico en las hojas en un 49.2% (50 ppm), 67.5% (100 ppm) y 71.5% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina totales tuvo un aumento del 25.6% (50ppm), 73.6% (100 ppm) y 34.2% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH fue registrado en las 100 ppm (49%) mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 500 ppm (42%).

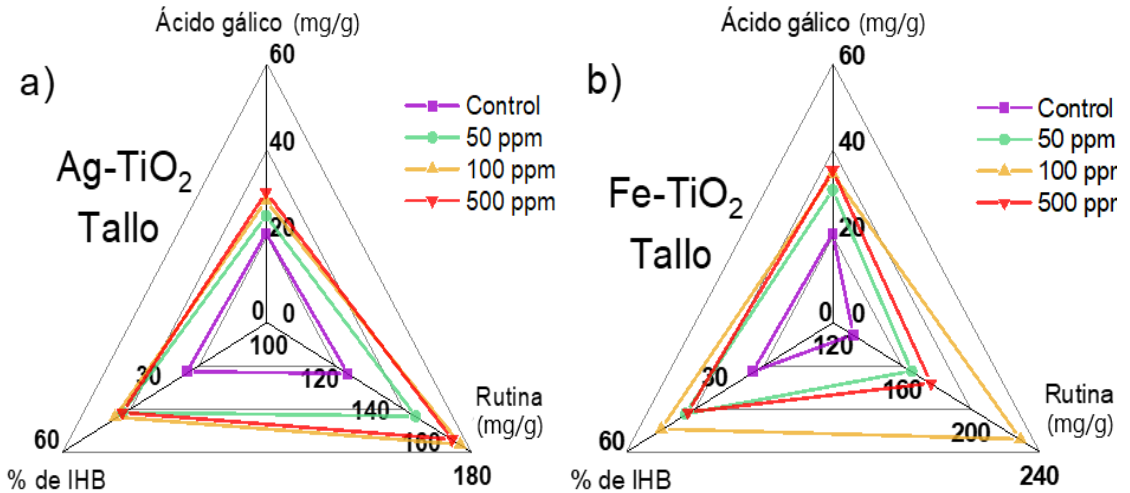


Figura 59 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en el tallo de la alfalfa tratada con a) Ag-TiO₂ y b) Fe-TiO₂.

La Figura 60-a corresponde a los datos de metabolitos secundarios y % de inhibición del radical DPPH para las raíces de alfalfa donde las nanopartículas sin dopar mostraron un aumento del 37.9% (50 ppm), 9.6% (100 ppm) y 18.5% (500 ppm) en la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico, la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 22.6% (50ppm), 22.3% (100 ppm) y 30.3% (500ppm), mayor el porcentaje de inhibición del radical DPPH fue registrado en las 50 ppm (47.2%) mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (44%).

La Figura 60-b muestra los resultados obtenidos en las raíces, bajo el tratamiento de Fe-TiO₂, donde se muestra un aumento de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. Gálico en las raíces en un 34% (50 ppm), 70.5% (100 ppm) y 28.4% (500 ppm), la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina tuvo un aumento del 23.1% (50ppm), 12.7% (100 ppm) y 42% (500ppm), el mayor porcentaje de inhibición del radical fue registrado en las 50 ppm (38.8%) mientras que el menor porcentaje fue registrado en las 100 ppm (35%).

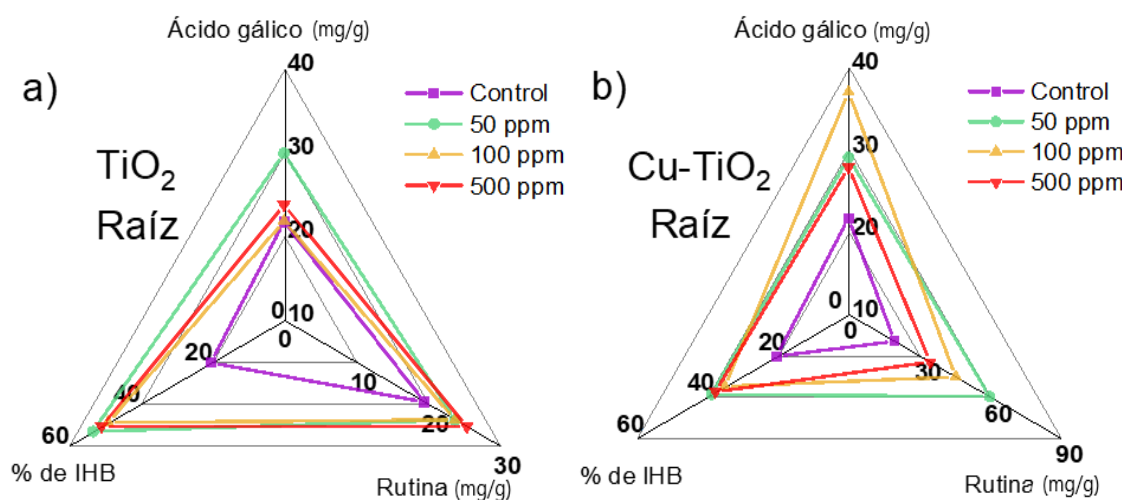


Figura 60 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en la raíz de la alfalfa tratada con a) TiO₂ y b) Cu-TiO₂.

Las nanopartículas dopadas con plata (Figura 61-a) muestran un aumento de 8% (50 ppm), 25% (100 ppm) y 18% (500 ppm) en la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico, un aumento del 26% (50 ppm) 32% (100 ppm) y 16% (500 ppm) en la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina y el porcentaje de inhibición del radical aumentó a un valor de 36% para 50 ppm, 47% para ppm y 40% para 500 ppm.

Las nanopartículas dopadas con hierro (Figura 61-b) significaron en un aumento del 6% (50 ppm) 16% (100 ppm) y 38% (500 ppm) en la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ac. gálico, a su vez un aumento en la concentración de flavonoides expresados como mg equivalentes de rutina del 9% (50 ppm) 37% (100 ppm) y 14% (500 ppm), por último, el porcentaje de inhibición del radical aumentó a un 38.8% (50 ppm), 35% (100 ppm) y 37% (500 ppm).

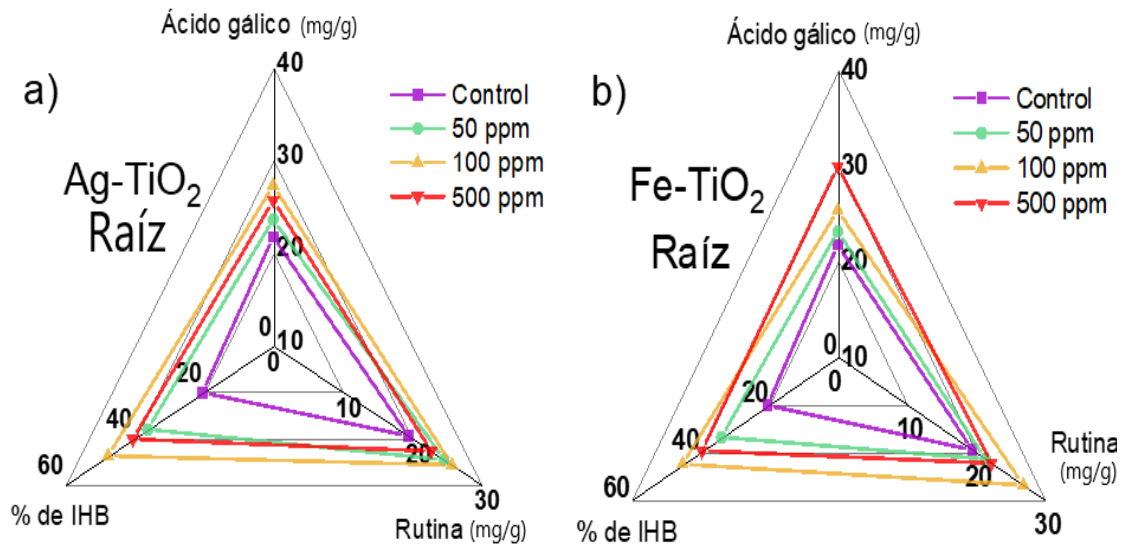


Figura 61 Gráficas de radar con la cuantificación de metabolitos secundarios y porcentaje de inhibición presentes en la raíz de la alfalfa tratada con a) Ag-TiO₂ y b) Fe-TiO₂.

Los resultados muestran que la alfalfa (*Medicago sativa*) tratada con nanopartículas de TiO₂ en las 3 concentraciones (50, 100 y 500 ppm) sufre un estrés por parte de la presencia del material, sin embargo los efectos observados en la morfología y el contenido de metabolitos no son claros con respecto al aumento en la concentración de las nanopartículas, habiendo casos donde las reducciones de tamaño fluctuaban en la 3 concentraciones sin seguir un patrón, dicho efecto es diferente al cambiar el dopado, estas fluctuaciones pueden estar relacionadas con la modificación química sufrida por el dopante el cual afecta las propiedades fotocatalíticas del TiO₂ y por ende genera diferentes grados de estrés y daño oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno, activando mecanismos celulares para la creación de metabolitos secundarios a partir de las rutas primarias lo que pudiera explicar la reducción de tamaño debido al gasto de los componentes primarios para el desarrollo de la planta, como lo son los carbohidratos y proteínas [116], [117].

A su vez la variación de tamaño debido al método de síntesis empleado otorga a la nanopartícula la capacidad de internalizarse en diferentes tejidos siendo el dióxido de titanio sintetizado por microondas el más susceptible a ser translocado debido a su tamaño [11], las respuestas obtenidas pueden ser relacionadas con

el efecto de hormesis donde las concentraciones bajas significan en un estrés toxicológico pero a medida de aumentar la concentración se genera una inhibición de dicho efecto [118], [119].

7. Conclusiones

El análisis SEM mostró nanopartículas de morfología amorfa para ambos métodos de síntesis donde se observó una reducción en la distribución de tamaños para las nanopartículas sintetizadas por el método sol gel asistido por microondas.

A través del uso de EDS se corroboró la presencia de las especies dopantes de Ag, Fe y Cu para las nanopartículas sintetizadas por ambos métodos.

El análisis XRD corroboró la presencia de las fases cristalina anatasa presentando las señales características de dicha fase, a su vez no se observaron corrimientos ni señales nuevas con respecto a los dopantes debido a la baja concentración de estos a su vez no se observó la presencia de otras fases cristalinas del TiO_2 , la medición de tamaño de cristalito muestra que las nanopartículas sintetizadas por sol gel tienen un tamaño de cristalito promedio de 9 nm siendo mayor a los 7.4 nm obtenidos mediante el acople a microondas.

El análisis Raman permitió corroborar nuevamente la presencia de la fase anatasa sin mostrar señales de otra fase cristalina, a su vez no se observó corrimiento en las señales relacionado al estrés residual en la red cristalina, esto debido a la baja concentración de los dopantes.

Los germinados de alfalfa (*Medicago sativa*) crecido en sustrato no fueron afectados en la velocidad de germinación ni el tiempo de aparición de la hoja verdadera para todas las concentraciones tipos de nanopartículas y métodos de síntesis, a pesar de haber aumentado la concentración de nanopartículas cada tercer día.

Las plantas tratadas con nanopartículas de dióxido de titanio y sus variantes dopadas en ambos métodos de síntesis, mostraron efectos relacionados con la baja absorción de nutrientes como el nitrógeno, boro y potasio. Esto puede deberse a un daño causado en la capa celular de la endodermis en las raíces donde se genera un movimiento de dichos elementos fuera de las células vegetales, a su vez una aglomeración de éstas en la raíz puede causar un bajo gradiente de transporte de iones.

El tamaño de tallo en las plantas fue reducido por la presencia de las nanopartículas en ambos métodos de síntesis a diferentes concentraciones. Sin embargo, los efectos presenciados varían con respecto a cada nanopartícula sin mostrar un patrón claro con respecto al aumento en la concentración, esto puede ser causado por modificación química otorgada por el tipo de dopante alterando las propiedades fotocatalíticas, a su vez el tamaño de la nanopartícula y su posibilidad de internalizarse en las células vegetales modifican los efectos observados.

El tamaño en las hojas de las plantas también sufrió un efecto de reducción por ambos métodos de síntesis y dopados. Sin embargo, el efecto negativo en el tamaño reducía en el tallo secundario, esto se puede deber a que los efectos negativos del TiO_2 en la planta se concentran en el tallo principal.

La concentración de clorofila se vio disminuida en las plantas tratadas con dióxido de titanio sintetizado por sol gel. Sin embargo, esto se puede deber a una combinación del estrés de las nanopartículas con el ataque de una plaga la cual dañó a aún más la estructura de la planta, a su vez las plantas tratadas por las nanopartículas sintetizadas por microondas mostraron una reducción en el contenido de clorofila a excepción de las 50 ppm para las nanopartículas sin dopar y dopadas con Ag donde se puede concluir que a bajas concentraciones el TiO_2 puede promover la presencia de clorofila mientras que a concentraciones altas esta disminuye.

El análisis de metabolitos secundarios y % de inhibición del radical DPPH en las plantas tratadas con nanopartículas sintetizadas por ambos métodos mostro un

aumento en la concentración de estos en hoja, tallo y raíz a comparación del control, significando en un estrés mayor en la planta al estar en presencia de las nanopartículas en múltiples concentraciones, este estrés inducido puede ser relacionada con las propiedades fotocatalíticas de TiO_2 aumentado la concentración de especies reactivas de oxígeno y por ende induciendo un estrés toxicológico, a su vez esto pudo ser causado por una posible translocación de las nanopartículas a otros tejidos causando un daño en la células ya sea por interacciones químicas o mecánicas.

8. Perspectivas a futuro

Los efectos vistos en las características como el largo de tallo de la planta muestran una reducción al estar en contacto con una concentración de dióxido de titanio por un tiempo en concreto sin embargo no se vio un comportamiento escalonado dependiente de la concentración de tal manera que se propone añadir concentraciones intermedias con fin de comprender de una manera más exacta el efecto conforme se lleva un aumento en la concentración de la nanopartícula pudiendo realizar curvas de hormesis que describe la dosis respuesta de un compuesto al estar en contacto con un ser vivo.

La planta muestra un aumento en el contenido de metabolitos secundarios sin embargo también se muestran deficiencias de micronutrientes producto de la presencia de nanopartículas, como finalidad para generar un patrón de toxicología de las nanopartículas se propone realizar una determinación de la presencia de las nanopartículas en partes como la raíz, tallo y hoja de tal manera de conocer si las nanopartículas pudieron ser translocadas a otros órganos con fin de poder relacionar este efecto con el aumento en el contenido de metabolitos secundarios así como un análisis de la presencia de dióxido de titanio en el sustrato con fin de determinar la concentración final de nanopartículas que han entrado en contacto con la planta.

9. Referencias

- [1] A. N. Shipway, E. Katz, y I. Willner, «Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications», *ChemPhysChem*. 2000, doi: 10.1002/1439-7641(20000804)1:1<18::AID-CPHC18>3.0.CO;2-L.
- [2] M. Naito, T. Yokoyama, K. Hosokawa, y K. Nogi, *Nanoparticle Technology Handbook*. 2018.
- [3] M. De, P. S. Ghosh, y V. M. Rotello, «Applications of nanoparticles in biology», *Advanced Materials*. 2008, doi: 10.1002/adma.200703183.
- [4] T. V. Duncan, «Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors», *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.07.017.
- [5] H. N. Cheng, K. T. Klasson, T. Asakura, y Q. Wu, «Nanotechnology in agriculture», 2016, doi: 10.1021/bk-2016-1224.ch012.
- [6] J. S. Duhan, R. Kumar, N. Kumar, P. Kaur, K. Nehra, y S. Duhan, «Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture», *Biotechnology Reports*. 2017, doi: 10.1016/j.btre.2017.03.002.
- [7] A. D. Servin y J. C. White, «Nanotechnology in agriculture: Next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk», *NanoImpact*, vol. 1, pp. 9-12, 2016, doi: 10.1016/j.impact.2015.12.002.
- [8] M. Kah y T. Hofmann, «Nanopesticide research: Current trends and future priorities», *Environment International*. 2014, doi: 10.1016/j.envint.2013.11.015.
- [9] R. Raliya, V. Saharan, C. Dimkpa, y P. Biswas, «Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.7b02178.
- [10] F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, y B. Nowack, «Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world», *Journal of Nanoparticle Research*. 2012, doi: 10.1007/s11051-012-1109-9.
- [11] D. K. Tripathi et al., «An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity», *Plant Physiol.*

Biochem., vol. 110, pp. 2-12, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030>.

- [12] A. Elsaesser y C. V. Howard, «Toxicology of nanoparticles», *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
- [13] R. K. D. Peterson y L. G. Higley, *Biotic stress and yield loss*. 2000.
- [14] *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. 2010.
- [15] H. Azeez y K. Ibrahim, «Effect of Biotic Elicitors on Secondary Metabolite Production in Cell Suspensions of *Hypericum triquetrifolium* Turra», *Bull. UASVM Hortic.*, vol. 702013, pp. 1843-5394, sep. 2013.
- [16] S. Ferrari, «Biological Elicitors of Plant Secondary Metabolites: Mode of Action and Use in the Production of Nutraceuticals», *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 698, pp. 152-166, ene. 2010, doi: 10.1007/978-1-4419-7347-4_12.
- [17] C. C. Giri y M. Zaheer, «Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal», *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC*, vol. 126, n.º 1, pp. 1-18, 2016, doi: 10.1007/s11240-016-0985-6.
- [18] G. Marslin, C. J. Sheeba, y G. Franklin, «Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst», *Front. Plant Sci.*, 2017, doi: 10.3389/fpls.2017.00832.
- [19] K. Večeřová et al., «Changes of primary and secondary metabolites in barley plants exposed to CdO nanoparticles», *Environ. Pollut.*, vol. 218, pp. 207-218, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.013>.
- [20] C. Gong, L. Wang, X. Li, H. Wang, Y. Jiang, y W. Wang, «Effect of Y₂O₃ Nanoparticles on Growth of Maize Seedlings», *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 300, p. 52049, ago. 2019, doi: 10.1088/1755-1315/300/5/052049.
- [21] J. Xu, X.-S. Luo, Y. Wang, y Y. Feng, «Evaluation of zinc oxide nanoparticles on lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and soil bacterial community», *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 25, dic. 2017, doi: 10.1007/s11356-017-0953-7.
- [22] D. Wang, X. Ma, W. Zhang, H. Pei, y Y. Chen, «The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for

- food safety», *Met. Integr. Biometal Sci.*, vol. 4, pp. 1105-1112, sep. 2012, doi: 10.1039/c2mt20149f.
- [23] A. Fujishima, T. N. Rao, y D. A. Tryk, «Titanium dioxide photocatalysis», *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2000, doi: 10.1016/S1389-5567(00)00002-2.
- [24] S. Bagheri, N. Muhd Julkapli, y S. Bee Abd Hamid, «Titanium dioxide as a catalyst support in heterogeneous catalysis», *Scientific World Journal*. 2014, doi: 10.1155/2014/727496.
- [25] C. Kole, D. S. Kumar, y M. V. Khodakovskaya, *Plant nanotechnology: Principles and practices*. 2016.
- [26] R. Javed, B. Yucesan, M. Zia, y E. Gurel, «Elicitation of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown Under ZnO and CuO Nanoparticles Stress», *Sugar Tech*, vol. 20, n.º 2, pp. 194-201, 2018, doi: 10.1007/s12355-017-0539-1.
- [27] J. R. Hanson, *Natural Products: The Secondary Metabolites*. 2006.
- [28] M. Bundschuh et al., «Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?», *Environ. Sci. Eur.*, vol. 30, 2018, doi: 10.1186/s12302-018-0132-6.
- [29] D. W. Hobson, «Nanotoxicology», *Int. J. Toxicol.*, vol. 35, n.º 1, pp. 3-4, ene. 2016, doi: 10.1177/1091581816631729.
- [30] S. Johnson, «Nanotechnology», en *Encyclopedia of Applied Ethics*, 2012.
- [31] B. Bhushan, «Introduction to nanotechnology», *Springer Handbooks*. 2017, doi: 10.1007/978-3-662-54357-3_1.
- [32] «Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology», *Choice Rev. Online*, 2005, doi: 10.5860/choice.42-2552a.
- [33] «Springer handbook of nanotechnology», *Choice Rev. Online*, 2004, doi: 10.5860/choice.42-0968.
- [34] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, y M. K. Danquah, «Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations.», *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, pp. 1050-1074, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.98.

- [35] D. Jariwala, V. K. Sangwan, L. J. Lauhon, T. J. Marks, y M. C. Hersam, «Carbon nanomaterials for electronics, optoelectronics, photovoltaics, and sensing», *Chemical Society Reviews*. 2013, doi: 10.1039/c2cs35335k.
- [36] A. Krueger, «Carbon nanomaterials», *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2014, doi: 10.3762/bjoc.10.186.
- [37] C. N. R. Rao, S. R. C. Vivekchand, K. Biswas, y A. Govindaraj, «Synthesis of inorganic nanomaterials», *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2006, doi: 10.1039/b708342d.
- [38] G. Cao, *NANOSTRUCTURES AND NANOMATERIALS - Synthesis, Properties and Applications*. 2010.
- [39] R. Kumar y S. Lal, «Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review», *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.*, vol. 3, sep. 2014, doi: 10.4172/2324-8777.1000150.
- [40] S. Din, «Applications of nanocomposites, a review», may 2018, doi: 10.24294/can.v0i0.875.
- [41] D. Wellia, Y. Kusumawati, L. Diguna, y M. Amal, «Introduction of Nanomaterials for Photocatalysis», 2017, pp. 1-17.
- [42] Z. Qin, T. Su, y H. Ji, «Photocatalytic Nanomaterials for the Energy and Environmental Application», 2018, pp. 353-401.
- [43] X. Chen y S. S. Mao, «Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications», *Chemical Reviews*. 2007, doi: 10.1021/cr0500535.
- [44] X. Chen et al., «Doped Semiconductor Nanomaterials», *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 5, pp. 1408-1420, oct. 2005, doi: 10.1166/jnn.2005.310.
- [45] N. V Stetsyk, V. G. Antonyuk, y M. M. Rudka, «Semiconductor Nanomaterials and Nanocrystals», *J. Nano- Electron. Phys.*, vol. 7, pp. 1-12, jun. 2015.
- [46] A. Fujishima, X. Zhang, y D. A. Tryk, «TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena», *Surface Science Reports*. 2008, doi: 10.1016/j.surfrep.2008.10.001.

- [47] W. R. Siah, H. Lintang, M. Shamsuddin, y L. Yuliati, «High photocatalytic activity of mixed anatase-rutile phases on commercial TiO₂ nanoparticles», IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng., vol. 107, p. 12005, feb. 2016, doi: 10.1088/1757-899X/107/1/012005.
- [48] Y. C. Nah, I. Paramasivam, y P. Schmuki, «Doped TiO₂ and TiO₂ nanotubes: Synthesis and applications», ChemPhysChem. 2010, doi: 10.1002/cphc.201000276.
- [49] M. Khairy y W. Zakaria, «Effect of metal-doping of TiO₂ nanoparticles on their photocatalytic activities toward removal of organic dyes», Egypt. J. Pet., 2014, doi: 10.1016/j.ejpe.2014.09.010.
- [50] A. Zaleska, «Doped-TiO₂: A Review», Recent Pat. Eng., 2008, doi: 10.2174/187221208786306289.
- [51] O. Carp, C. L. Huisman, y A. Reller, «Photoinduced reactivity of titanium dioxide», Progress in Solid State Chemistry. 2004, doi: 10.1016/j.progsolidstchem.2004.08.001.
- [52] Z. P. Aguilar, «Nanotoxicology and Remediation», en Nanomaterials for Medical Applications, 2013.
- [53] Nanoethics and Nanotoxicology. 2011.
- [54] Z. Hossain, G. Mustafa, y S. Komatsu, «Plant responses to nanoparticle stress», International Journal of Molecular Sciences. 2015, doi: 10.3390/ijms161125980.
- [55] H. P. S. Makkar, P. Siddhuraju, y K. Becker, «Plant secondary metabolites.», Methods Mol. Biol. Clifton NJ, 2007, doi: 10.1002/9781119081005.ch15.
- [56] A. Seca y D. Pinto, «Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites», Medicines, vol. 6, jun. 2019, doi: 10.3390/medicines6020066.
- [57] R. Yadav, P. Arora, y A. Chaudhury, «Plant Secondary Metabolites: From Diseases to Health», 2012.
- [58] F. Poiroux-Gonord, L. Bidel, A.-L. Fanciullino, H. Gautier, F. Lopez, y L. Urban, «Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by

- Agronomic Approaches», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, nov. 2010, doi: 10.1021/jf1037745.
- [59] U. Graham et al., «From Dose to Response: In Vivo Nanoparticle Processing and Potential Toxicity», en *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 947, 2017, pp. 71-100.
- [60] N. Monteiro-Riviere y T. CL, *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects*,. 2007.
- [61] I. Montes-Burgos, D. Walczyk, P. Hole, J. Smith, I. Lynch, y K. Dawson, «Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies», *J. Nanoparticle Res.*, vol. 12, pp. 47-53, nov. 2009, doi: 10.1007/s11051-009-9774-z.
- [62] M. Wani, M. Hashim, F. Nabi, y M. Malik, «Nanotoxicity: Dimensional and Morphological Concerns», *Adv. Phys. Chem.*, vol. 2011, ene. 2011, doi: 10.1155/2011/450912.
- [63] O. Schmid y T. Stoeger, «Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung», *J. Aerosol Sci.*, vol. 99, pp. 133-143, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2015.12.006>.
- [64] J. Jiang, G. Oberdörster, A. Elder, R. Gelein, P. Mercer, y P. Biswas, «Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase?», *Nanotoxicology*, vol. 2, pp. 33-42, mar. 2008, doi: 10.1080/17435390701882478.
- [65] A. Borowik et al., «The Impact of Surface Functionalization on the Biophysical Properties of Silver Nanoparticles», *Nanomaterials*, vol. 9, p. 973, jul. 2019, doi: 10.3390/nano9070973.
- [66] A. K. Singh, «Introduction to Nanoparticles and Nanotoxicology», en *Engineered Nanoparticles*, 2016.
- [67] D. Singh y A. Kumar, «Impact of Irrigation Using Water Containing CuO and ZnO Nanoparticles on Spinach oleracea Grown in Soil Media», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 97, jun. 2016, doi: 10.1007/s00128-016-1872-x.

- [68] E. Corredor et al., «Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: In situ subcellular identification», *BMC Plant Biol.*, vol. 9, p. 45, may 2009, doi: 10.1186/1471-2229-9-45.
- [69] W.-N. Wang, J. Tarafdar, y P. Biswas, «Nanoparticle synthesis and delivery by an aerosol route for watermelon plant foliar uptake», *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, ene. 2013, doi: 10.1007/s11051-013-1417-8.
- [70] C. García-Gómez y M. D. Fernández, «Chapter Four - Impacts of metal oxide nanoparticles on seed germination, plant growth and development», en *Analysis, fate, and toxicity of engineered nanomaterials in plants*, vol. 84, S. K. Verma y A. K. B. T.-C. A. C. Das, Eds. Elsevier, 2019, pp. 75-124.
- [71] A. Prasad, C. Astete, A. Bodoki, M. Windham, E. Bodoki, y C. Sabliov, «Zein Nanoparticles Uptake and Translocation in Hydroponically Grown Sugar Cane Plants», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, ago. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b02487.
- [72] K. J. Dietz y S. Herth, «Plant nanotoxicology», *Trends in Plant Science*. 2011, doi: 10.1016/j.tplants.2011.08.003.
- [73] N. Suzuki, R. M. Rivero, V. Shulaev, E. Blumwald, y R. Mittler, «Abiotic and biotic stress combinations», *New Phytol.*, 2014, doi: 10.1111/nph.12797.
- [74] A. Ramakrishna y G. A. Ravishankar, «Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants», *Plant Signaling and Behavior*. 2011, doi: 10.4161/psb.6.11.17613.
- [75] K. Apel y H. Hirt, «REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction», *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004, doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- [76] F. K. Choudhury, R. M. Rivero, E. Blumwald, y R. Mittler, «Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination», *Plant J.*, 2017, doi: 10.1111/tpj.13299.
- [77] S. S. Gill y N. Tuteja, «Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants», *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

- [78] G. R. Cramer, K. Urano, S. Delrot, M. Pezzotti, y K. Shinozaki, «Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective», *BMC Plant Biology*. 2011, doi: 10.1186/1471-2229-11-163.
- [79] A. Mithöfer, B. Schulze, y W. Boland, «Biotic and heavy metal stress response in plants: Evidence for common signals», *FEBS Lett.*, 2004, doi: 10.1016/j.febslet.2004.04.011.
- [80] N. J. Atkinson y P. E. Urwin, «The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field», *Journal of Experimental Botany*. 2012, doi: 10.1093/jxb/ers100.
- [81] I. Ben Rejeb, V. Pastor, y B. Mauch-Mani, «Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms», *Plants*. 2014, doi: 10.3390/plants3040458.
- [82] L. Tumburu, C. Andersen, P. Rygiewicz, y J. Reichman, «Phenotypic and genomic responses to titanium dioxide and cerium oxide nanoparticles in *Arabidopsis germinants*», *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 34, ene. 2015, doi: 10.1002/etc.2756.
- [83] Y. Tang, S. Wu, L. Huang, J. Head, D. Chen, y I. Kong, «Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles is Related to Both Dissolved Metals Ions and Adsorption of Particles on Seed Surfaces», *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, vol. 03, ene. 2012, doi: 10.4172/2157-7463.1000126.
- [84] Z. Doğaroğlu y N. Köleli, «Effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on germination and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.)», *Appl. Ecol. Environ. Res.*, vol. 15, pp. 1499-1510, ene. 2017, doi: 10.15666/aeer/1503_14991510.
- [85] N. Regier, C. Cosio, N. von Moos, y V. I. Slaveykova, «Effects of copper-oxide nanoparticles, dissolved copper and ultraviolet radiation on copper bioaccumulation, photosynthesis and oxidative stress in the aquatic macrophyte *Elodea nuttallii*», *Chemosphere*, vol. 128, pp. 56-61, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.078>.
- [86] S. Kim, S. Lee, y I.-S. Lee, «Alteration of Phytotoxicity and Oxidant Stress Potential by Metal Oxide Nanoparticles in *Cucumis sativus*», *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 223, jun. 2012, doi: 10.1007/s11270-011-1067-3.

- [87] M. H. Siddiqui y M. H. Al-Wahaibi, «Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.)», *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 21, n.º 1, pp. 13-17, ene. 2014, doi: 10.1016/j.sjbs.2013.04.005.
- [88] D. Stampoulis, S. K. Sinha, y J. C. White, «Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, n.º 24, pp. 9473-9479, dic. 2009, doi: 10.1021/es901695c.
- [89] T. N. V. K. V. Prasad et al., «EFFECT OF NANOSCALE ZINC OXIDE PARTICLES ON THE GERMINATION, GROWTH AND YIELD OF PEANUT», *J. Plant Nutr.*, vol. 35, n.º 6, pp. 905-927, abr. 2012, doi: 10.1080/01904167.2012.663443.
- [90] H. Feizi, P. Rezvani Moghaddam, N. Shahtahmasebi, y A. Fotovat, «Impact of Bulk and Nanosized Titanium Dioxide (TiO₂) on Wheat Seed Germination and Seedling Growth», *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 146, n.º 1, pp. 101-106, abr. 2012, doi: 10.1007/s12011-011-9222-7.
- [91] M. L. López-Moreno, G. de la Rosa, J. A. Hernández-Viezcas, J. R. Peralta-Videa, y J. L. Gardea-Torresdey, «X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) Corroboration of the Uptake and Storage of CeO₂ Nanoparticles and Assessment of Their Differential Toxicity in Four Edible Plant Species», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, n.º 6, pp. 3689-3693, mar. 2010, doi: 10.1021/jf904472e.
- [92] D. Lin y B. Xing, «Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth», *Environ. Pollut.*, vol. 150, n.º 2, pp. 243-250, nov. 2007, doi: 10.1016/j.envpol.2007.01.016.
- [93] H. Salehi, A. Chehregani, L. Lucini, A. Majd, y M. Gholami, «Morphological, proteomic and metabolomic insight into the effect of cerium dioxide nanoparticles to *Phaseolus vulgaris* L. under soil or foliar application», *Sci. Total Environ.*, vol. 616-617, pp. 1540-1551, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.159.
- [94] D. Al Qassy et al., «Remodeling of root morphology by CuO and ZnO nanoparticles: effects on drought tolerance for plants colonized by a beneficial pseudomonad», *Botany*, vol. 96, n.º 3, pp. 175-186, 2017, doi: 10.1139/cjb-2017-0124.

- [95] L. Bao-shan, D. Shao-qi, L. Chun-hui, F. Li-jun, Q. Shu-chun, y Y. Min, «Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings», *J. For. Res.*, vol. 15, n.º 2, pp. 138-140, jun. 2004, doi: 10.1007/BF02856749.
- [96] L. Zheng, F. Hong, S. Lu, y C. Liu, «Effect of Nano-TiO₂ on Strength of Naturally Aged Seeds and Growth of Spinach», *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 104, n.º 1, pp. 083-092, 2005, doi: 10.1385/BTER:104:1:083.
- [97] L. Yang y D. J. Watts, «Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles», *Toxicol. Lett.*, vol. 158, n.º 2, pp. 122-132, ago. 2005, doi: 10.1016/j.toxlet.2005.03.003.
- [98] M. P. Johnson, «Photosynthesis», *Essays Biochem.*, vol. 60, n.º 3, pp. 255-273, oct. 2016, doi: 10.1042/EBC20160016.
- [99] V. L. Reddy Pullagurala et al., «Finding the conditions for the beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants-A review», *Environ. Pollut.*, vol. 241, pp. 1175-1181, 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.06.036.
- [100] Z. Zahra et al., «Exposure–Response of Wheat Cultivars to TiO₂ Nanoparticles in Contrasted Soils», *Soil Sediment Contam.*, vol. 28, n.º 2, pp. 184-199, 2019, doi: 10.1080/15320383.2018.1561650.
- [101] R. Suriyaprabha, G. Karunakaran, R. Yuvakkumar, V. Rajendran, y N. Kannan, «Silica Nanoparticles for Increased Silica Availability in Maize (*Zea mays*. L) Seeds Under Hydroponic Conditions», *Curr. Nanosci.*, vol. 8, n.º 6, pp. 902-908, nov. 2012, doi: 10.2174/157341312803989033.
- [102] P. M. G. Nair y I. M. Chung, «Study on the correlation between copper oxide nanoparticles induced growth suppression and enhanced lignification in Indian mustard (*Brassica juncea* L.)», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 113, pp. 302-313, mar. 2015, doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.013.
- [103] J. J. Zhong, «Plant secondary metabolites», en *Comprehensive Biotechnology*, 2019.
- [104] R. N. BENNETT y R. M. WALLSGROVE, «Secondary metabolites in plant defence mechanisms», *New Phytol.*, 1994, doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x.

- [105] P. G. Waterman, «Secondary metabolites», *Proc. R. Soc. Edinb. Sect. B Biol. Sci.*, 1996, doi: 10.1017/s026972700000614x.
- [106] M. Olszowy, «What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?», *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 144, pp. 135-143, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>.
- [107] L. Yang, K. S. Wen, X. Ruan, Y. X. Zhao, F. Wei, y Q. Wang, «Response of plant secondary metabolites to environmental factors», *Molecules*. 2018, doi: 10.3390/molecules23040762.
- [108] N. Theis y M. Lerdau, «The evolution of function in plant secondary metabolites», *International Journal of Plant Sciences*. 2003, doi: 10.1086/374190.
- [109] J. B. Harborne, «Plant Secondary Metabolism», *Phytochemistry*, 2000, doi: 10.1016/s0031-9422(00)00020-0.
- [110] E. Becker, L. Nissen, y L. Skibsted, «Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects», *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 219, pp. 561-571, nov. 2004, doi: 10.1007/s00217-004-1012-4.
- [111] S. Belhaoues, S. Amri, y M. Bensouilah, «Major phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Anthemis praecox* Link aerial parts», *South Afr. J. Bot.*, vol. 131, pp. 200-205, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.018>.
- [112] A. Yadav, R. Kumari, A. Yadav, J. P. Mishra, Dr. S. Srivastava, y S. Prabha, «Antioxidants and its functions in human body - A Review», *Res. Environ. Life Sci.*, vol. 9, pp. 1328-1331, nov. 2016.
- [113] L. Chen, R. Long, G. Huang, y H. Huang, «Extraction and antioxidant activities in vivo of pumpkin polysaccharide», *Ind. Crops Prod.*, vol. 146, p. 112199, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112199>.
- [114] S. Ahmad, M. A. Arshad, S. Ijaz, U. Khurshid, F. Sofi, y R. Azam, «Review on methods used to determine Antioxidant activity», *Int. J. Multidiscip. Res. Dev.*, vol. 1, pp. 41-46, may 2014.
- [115] K. Escalante et al., «Microwave-assisted synthesis of (S)Fe/TiO₂ systems: Effects of synthesis conditions and dopant concentration on photoactivity»,

- Appl. Catal. B Environ., vol. s 140–141, pp. 213–224, 2013, doi: 10.1016/j.apcatb.2013.03.047.
- [116] R. Mohammadi, R. Maali-Amiri, y N. L. Mantri, «Effect of TiO₂ nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress», Russ. J. Plant Physiol., vol. 61, n.º 6, pp. 768-775, 2014, doi: 10.1134/S1021443714050124.
- [117] M. [Ruffini Castiglione], L. Giorgetti, L. Bellani, S. Muccifora, S. Bottega, y C. Spanò, «Root responses to different types of TiO₂ nanoparticles and bulk counterpart in plant model system *Vicia faba* L.», Environ. Exp. Bot., vol. 130, pp. 11-21, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.002>.
- [118] E. Agathokleous, Z. Feng, I. Iavicoli, y E. J. Calabrese, «The two faces of nanomaterials: A quantification of hormesis in algae and plants», Environ. Int., vol. 131, p. 105044, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105044>.
- [119] I. R. Bell, J. A. Ives, y B. J. Wayne, «Nonlinear Effects of Nanoparticles: Biological Variability from Hormetic Doses, Small Particle Sizes, and Dynamic Adaptive Interactions», Dose-Response, vol. 12, n.º 2, p. dose-response.13-025.Bell, 2014, doi: 10.2203/dose-response.13-025.Bell.
- [120] A. Zamudio-Méndez et al., «Self-Cleaning Activity on Concrete Surfaces Coated with Fe- and S-Doped TiO₂ Synthesized by Sol–Gel Microwave Method», J. Nanosci. Nanotechnol., vol. 17, pp. 5637-5645, 2017, doi: 10.1166/jnn.2017.13834.
- [121] J. B. BINDELL, «2.2 - SEM: Scanning Electron Microscopy», en Encyclopedia of Materials Characterization, C. R. Brundle, C. A. Evans, y S. Wilson, Eds. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992, pp. 70-84.
- [122] R. O. Y. H. GEISS, «3.1 - EDS: Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy», en Encyclopedia of Materials Characterization, C. R. Brundle, C. A. Evans, y S. Wilson, Eds. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992, pp. 120-134.
- [123] M. F. TONEY, «4.1 - XRD: X-Ray Diffraction», en Encyclopedia of Materials Characterization, C. R. Brundle, C. A. Evans, y S. Wilson, Eds. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992, pp. 198-213.

- [124] W. B. WHITE, «8.2 - Raman Spectroscopy», en Encyclopedia of Materials Characterization, C. R. Brundle, C. A. Evans, y S. Wilson, Eds. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992, pp. 428-441.
- [125] M. S. H. Akash y K. Rehman, «Ultraviolet-Visible (UV-VIS) Spectroscopy», en Essentials of Pharmaceutical Analysis, Singapore: Springer Singapore, 2020, pp. 29-56.
- [126] O. P. Sharma y T. K. Bhat, «DPPH antioxidant assay revisited», Food Chem., vol. 113, n.º 4, pp. 1202-1205, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>.
- [127] J. C. Rangel, J. Benavides Lozano, J. Heredia, L. Cisneros-Zevallos, y D. Jacobo-Velázquez, «The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination», Anal. Methods, vol. 5, p. 5990, 2013, doi: 10.1039/c3ay41125g.

10. Anexos

10.1. Síntesis de nanopartículas de TiO₂ por medio del método Sol-Gel

El proceso Sol-gel es un método para crear materiales cerámicos en la nano escala, el proceso involucra la transición de un sistema de una fase líquida “sol”, la cual mayormente está presente en forma coloidal pasando a una base sólida “gel”, usando este proceso es posible crear materiales cerámicos en múltiples formas, como películas, polvos, esferas, fibras o materiales porosos.

Los pasos que involucra el proceso de sol gel son los siguientes:

1. Preparación de una solución de sal metálica/agua o alóxido metálico/solvente orgánico (alcohol miscible en agua).
2. Formación del “sol”: la solución homogénea es convertida a un sol por medio de hidrólisis, es este paso ocurren ataques nucleofílicos del oxígeno en agua, resultando en la formación de un hidróxido metálico y alcohol como se aprecia en la Figura 62.

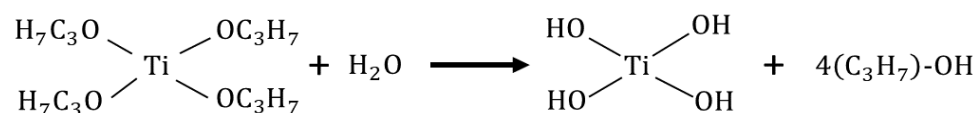


Figura 62 Fase de hidrolisis en la reacción solgel.

3. Formación del gel por condensación (Figura 51): se deja reposar el gel por horas ocurriendo la reacción entre 2 especies hidroxilo/alkoxilo generando uniones M-O-M liberando agua y alcohol, esta condensación resulta en un gel, una red inorgánica cubierta de fase líquida.

4. Secado: Al remover la parte líquida en condiciones supercríticas se forma

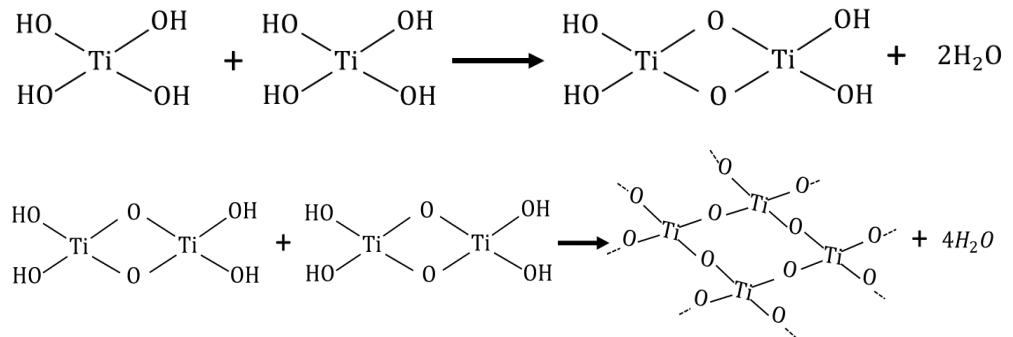


Figura 63 Fase de condensación en la reacción solgel.

un aerogel, si el secado se realiza a condiciones ambientales el gel generado es un xerogel, un calcinado permite generar un polvo cristalino.

El material inicial para la preparación del sol es usualmente compuesto orgánico metálicos como alkóxidos metálicos o sales inorgánicas, en una serie de reacciones de hidrolisis y polimerización se forma una suspensión coloidal o un sol.

10.1.1. Microondas para la síntesis de nanopartículas

La energía de microondas se utiliza en diversas aplicaciones, estas abarcan áreas como la comunicación, el procesamiento de alimentos y terapia médica las cuales son las más reconocidas, sin embargo, también es usada para el secado,

calcinación, descomposición, síntesis, sinterización y control de procesos químicos, siendo considerado un proceso verde ya que los procesos de síntesis son más controlados y hacen uso de solventes más seguros.

El sistema más común de generación de microondas y su transmisión consiste en un magnetrón como la fuente de microondas y una guía para las ondas, los magnetrones tienen un poder de salida mayor a 5 mega watts (MW), las frecuencias de salida van desde los 20 giga Hertz (GHz) a los 527 GHz,

Los instrumentos de microondas pueden ser divididos en dos tipos, los monomodales donde solo un recipiente puede ser irradiado, y los multimodales (Figura 64.) donde varios recipientes pueden ser irradiados al mismo tiempo, generando la posibilidad de realizar síntesis simultaneas, en lo equipo multimodales se hace uso de agitadores magnéticos o mesas rotatorias para mantener una distribución homogénea del campo electromagnético en el solvente, asegurando condiciones similares en todos los recipientes.

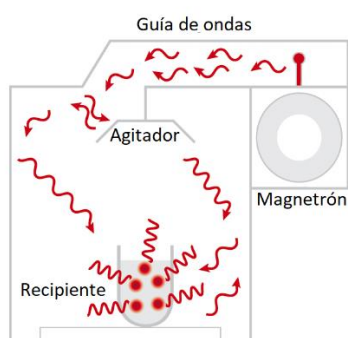


Figura 64 Diagrama de un microondas multimodal.

Figura 65 Recipientes de reacción y soportes para un microondas de síntesis química.

Los recipientes de reacción de los microondas pueden estar hechos de materiales como politetrafluoroetilenos como el teflón (Figura 65) los cuales ofrecen una alta resistencia a temperatura, reacción química, corrosión y estrés, cuarzo el cual tiene altas temperaturas de trabajo, baja expansión térmica y excelente resistencia al shock térmico, por último las polieteretercetonas son polímeros termoplásticos con excelentes propiedades mecánicas y químicas, resistiendo ataques a compuestos halogenados, ácidos y base de Lewis fuertes e hidrocarburos alifáticos.

Las microondas proporcionan una excelente técnica económica para procesar materiales semiconductores (SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , entre otros), la síntesis de microondas resulta en una fina distribución de nanopartículas altamente cristalinas, proporcionando energía directamente a la sustancia sin haber contacto entre la fuente de energía y el material y sin restricciones relacionadas con la conductividad térmica, pudiendo reducir los tiempos de reacción [115], [120].

10.2. Técnicas de caracterización

10.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía de barrido electrónica (SEM) provee de una imagen altamente amplificada de la superficie de un material, la resolución de un SEM puede alcanzar unos cuantos nanómetros y puede operar a magnificaciones de 10x hasta 300,000x, el SEM puede ofrecer información topográfica y a su vez otorga información con respecto a la composición elemental en la superficie del material.

El microscopio electrónico de barrido hace uso de un haz de electrones los cuales son dirigidos (en vacío) a una sonda, al interactuar el haz con la muestra

se presentan varias interacciones que pueden resultar en la emisión de electrones o fotones por la muestra, una fracción de estos electrones son colectados por detectores.

3 tipos de imágenes pueden ser producidas en un SEM, imágenes de electrones secundarios, retrodispersados, y mapeos de rayos-x, cuando un electrón del rayo primario de electrones interactúa con un átomo, puede experimentar una dispersión inelástica con los electrones del átomo o una dispersión elástica con el núcleo atómico, en la colisión inelástica con un electrón parte de la energía es transferida a otro electrón, si la energía excede la función trabajo del material, el electrón emitido puede escapar del sólido, cuando la energía del electrón emitido es menor a 50 EV son considerados electrones secundarios, la mayoría de estos electrones son producidos en los primeros nm de la superficie y son usados para producir las imágenes superficiales de muestra analizada (Figura 67).

Los electrones retrodispersados son aquellos cuyas energías superan los 50 EV, mientras más grande sea en número atómico de la muestra mayor cantidad de electrones retrodispersados se producirán, estos electrones son usados para producir imágenes que contrastan en nivel de brillo la composición de la muestra por el número atómico de los átomos que lo componen.

La instrumentación principal de un SEM (Figura 66) consiste en una fuente de electrones, lentes condensadores que redirigen el haz de electrones, bobinas deflectoras, una porta muestra y detectores de electrones. La función de la fuente de electrones es producir un haz de electrones que emana en un punto muy pequeño, la energía de la fuente puede abarcar desde 500 EV a 50 k eV, el material comúnmente usado es el tungsteno, los lentes demagnifican este punto y lo enfocan a la muestra, los 3 tipos de interacciones son detectadas por 3 detectores específicos.

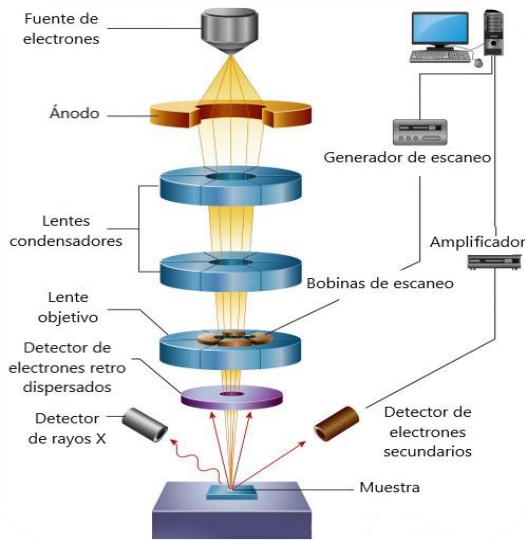


Figura 66 Esquema de un SEM.

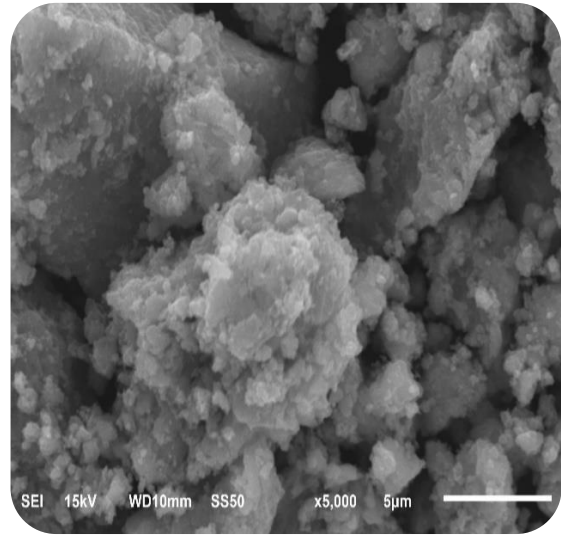


Figura 67 Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO_2 .

Las muestras requieren poca preparación para ser analizadas por un SEM, estas deben ser sólidas y no ser húmedas como materiales orgánicos o arcillas, deben ser capaces de aguantar un vacío de entre 10^{-5} a 10^{-6} torr, en caso de ser muestras conductoras la mayor limitante serán sus dimensiones con respecto al porta muestras, si la muestra es aislante puede ser recubierta por una capa de carbón, oro o algún otro metal [121]

10.2.2. Espectroscopía de energía dispersada (EDS)

Cuando los átomos en un material son ionizados por una radiación altamente energética, estos emiten rayos X característicos, EDS describe la técnica de espectroscopia de rayos X de energía dispersiva, la cual se basa en la dispersión de rayos X característicos, los instrumentos EDS frecuentemente vienen en conjunto con los microscopios electrónicos de barrido (SEM).

Los detectores EDS tienen la capacidad de identificar rayos X característicos de todos los elementos en la tabla periódica a partir del Berilio ($Z=4$) si estos están presentes en suficiente concentración, siendo el límite de detección $0.02\%W$ para elementos de $Z>10$.

Para producir rayo X característicos de cada elemento un átomo debe ser ionizado, lo que significa que un electrón de la capa interior tiene que ser removido por una radiación altamente energética, para que el átomo regrese a su estado base un electrón de un nivel más alto debe llenar el hueco de la capa interior, en el proceso se libera una cantidad de energía igual a la diferencia de energía potencial entre las dos capas, esta energía la cual es única para cada transición atómica será emitida como un fotón de rayos X.

La parte principal del EDS es un diodo tipo p-i-n (Figura 68) hecho a partir de cristal de silicio con átomos de litio difundidos en él, el litio es usado para para compensar las bajas concentraciones de impurezas neutralizándolas, en el proceso de la difusión el núcleo del cristal de silicio será intrínseco, pero el extremo alejado del litio será tipo p y el extremo del litio será tipo n.

Cuando un fotón de rayos X entra a la región intrínseca por el lado p, hay una probabilidad alta de que ionice un átomo de silicio por medio del efecto fotoeléctrico, resultando en un rayo X o un electrón Auger produciendo un par electrón hueco, estos acarreadores de carga se mueven libremente en la red, y son atraídos a un detector por medio de un campo que los dirige a un transistor de especialmente diseñado y montado atrás del cristal del Si, el transistor prepara la señal para ser introducida a un preamplificador que prepara la señal para el amplificador principal, la altura de la señal en el amplificador es proporcional a la salida del preamplificador, por lo tanto es proporcional a la energía de los rayos X (Figura 69) .

Los detectores son mantenidos bajo vacío y en temperatura de nitrógeno líquido para reducir el ruido electrónico e inhibir la difusión del litio cuando un voltaje es aplicado, una ventaja del EDS es que puede ser posicionado muy cerca de la muestra y presentar un ángulo alto de recolección de rayos X emitidos [122].

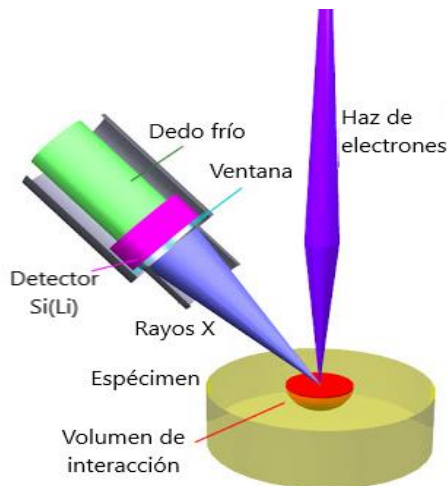


Figura 68 Diagrama de un EDS.

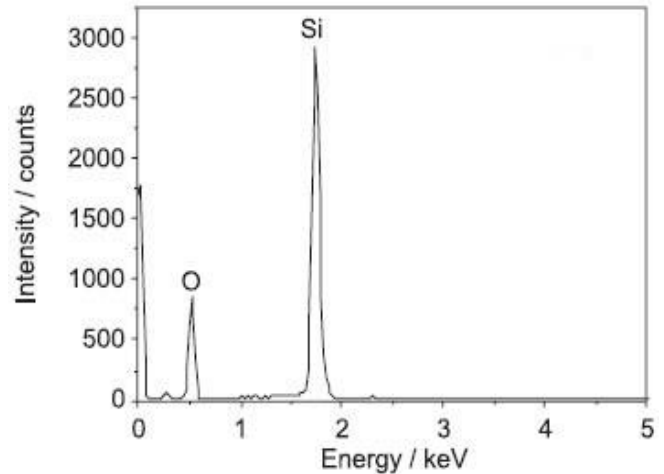


Figura 69 Análisis EDS de nanopartículas de SiO₂.

10.2.3. Difracción de rayos X (XRD)

La técnica de difracción de rayos equis es altamente usada para la identificación de fases cristalinas presentes en una muestra (Figura 71), así como medir propiedades estructurales como estreses, tamaño de grano, epitaxia, composición de fases, orientación preferida y defectos estructurales, el XRD también puede ser usado para la determinación del grosor en películas delgadas.

Las ventajas de esta técnica es que no requiere contacto directo con la muestra y no es destructiva, las señales medidas con el XRD pueden proveer análisis cuantitativo, la técnica puede estudiar cualquier elemento sin embargo su sensibilidad aumenta con elementos de número atómico mayor, la intensidad de difracción bajas para los números atómicos bajos lo convierte en una desventaja.

Los cristales consisten en planos de átomos que están espaciados a una distancia d , cualquier plano atómico puede ser distinguido por sus índices de Miller, estos son 3 intersecciones recíprocas del plano con los ejes a b y c , y son reducidos a los enteros más pequeños teniendo la misma proporción, así un

plano (hkl) intersecta con los ejes cristalográficos en a/h , b/k y c/l , el espaciamiento entre planos (hkl) es denotado por d_{hkl} .

Cuando hay interferencia constructiva de los rayos X dispersados por los planos atómicos del cristal, un pico de difracción es observado, la condición para interferencia constructiva por los planos con espaciamiento d_{hkl} es dada por la ley de Bragg.

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin(\Theta_{hkl}) \quad 2)$$

Donde Θ_{hkl} es el ángulo entre los planos atómicos y los rayos X incidentes, para que la difracción sea observada el detector debe ser posicionado de tal manera que el ángulo de difracción sea $2\Theta_{hkl}$ y el cristal sea coplanar con los rayos X incidentes y difractados, y que los ángulos entre el plano de difracción y los rayos X incidentes sean iguales a los ángulos de la ley de Bragg como se muestra en la Figura 70 [123].

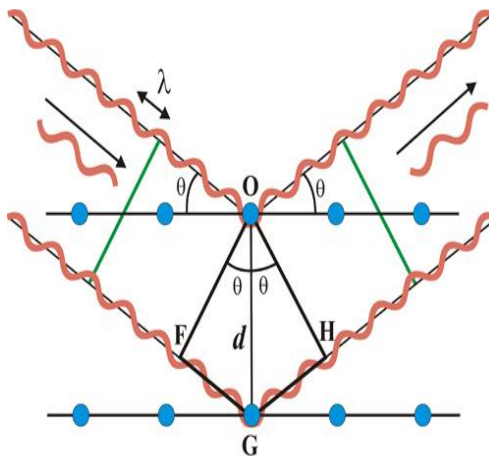


Figura 70 Ley de Bragg para XRD.

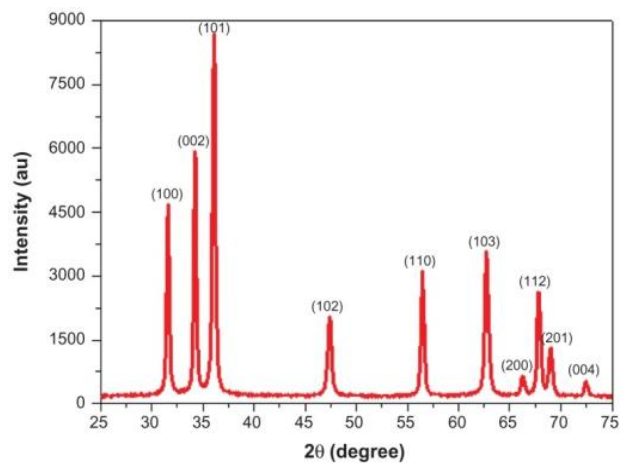


Figura 71 Patrón de difracción de rayos X para el óxido de zinc.

10.2.4. Espectroscopía Raman

Las moléculas y los cristales pueden ser imaginados como sistemas de esferas (átomos) conectadas por resortes (enlaces químicos), estos sistemas pueden

ser puestos en vibración, estos vibran en frecuencias que son determinadas por la masa de las esferas (pesos atómicos) y la dureza del resorte (constante de fuerza de enlace), el número posible de movimientos vibraciones es $3n-6$ para moléculas no lineales y $3n-3$ para cristales, donde n es el número de átomos en la molécula o en la celda primitiva del cristal. Las vibraciones moleculares se encuentran en frecuencias del rango de 10^{12} - 10^{14} Hz, las cuales toman lugar en la región infrarroja del espectro electro magnético.

El espectro Raman (Figura 73) surge del acoplamiento indirecto de la radiación de alta frecuencia, con las nubes electrónicas de los enlaces químicos, esta técnica ofrece información estructural, el espectro es más sensible a las longitudes, fuerzas y arreglos de los enlaces en un material a comparación de su composición química, el espectro Raman en cristales responde más a los detalles de los defectos y desordenes.

En la técnica Raman una luz intensa monocromática distorsiona la nube electrónica del enlace químico, almacenando cierta cantidad de energía, cuando el campo se invierte a medida que la onda pasa y la nube electrónica distorsionada se relaja irradiando la energía almacenada, la mayor parte de la es irradiada a la misma frecuencia que la luz incidente, este componente es llamada dispersión de Rayleigh, sin embargo una pequeña porción de la energía almacenada es transferida a la muestra excitando los modos vibracionales, bandas laterales débiles parecen en el espectro a frecuencias menores que la luz incidente, el proceso que excita los modos vibracionales es llamado dispersión de Stokes, estas se dividen en dos, las dispersiones anti Stokes se presentan cuando el material es térmicamente excitado, añadiendo más energía a la almacenada, las dispersiones Stokes corresponden a las anteriormente mencionadas como se muestra en la Figura 72.

Las muestras para analizar pueden ser líquidas, estas se miden en celdas especiales que tienen una ventana óptica en ángulos rectos, cuando se analizan muestras en polvo el tamaño de la partícula tiene poco efecto en el espectro Raman a menos de que sean menores a 100 nm, de esta manera el espectro de alta calidad puede obtenerse de polvos.

Las muestras que fluorescen no pueden ser analizadas ya que las bandas de fluorescencia son extremadamente anchas y tienen la suficiente intensidad para completamente enmascarar las dispersiones Raman más débiles [124].

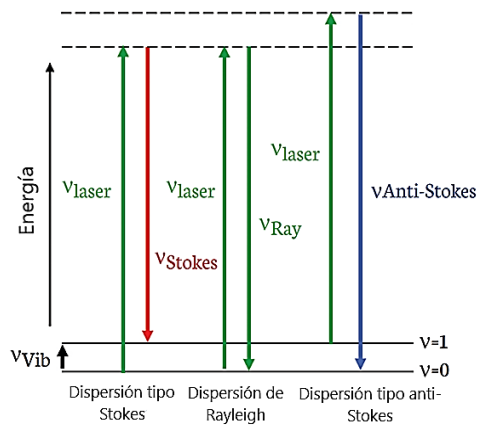


Figura 72 Posibilidades de dispersión de luz al interactuar con una muestra.

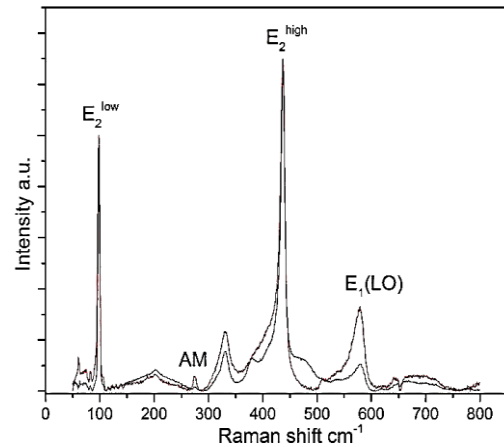


Figura 73 Espectro Raman del óxido de zinc.

10.2.5. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Esta técnica es considerada como la técnica espectrométrica más importante, esta técnica mide la interacción de las radiaciones electromagnéticas en una longitud de onda particular con la materia, estas longitudes de onda abarcan desde la región UV (10-400 nm) y la región visible (400 – 800 nm), en esta técnica el analito absorbe la luz de una longitud de onda específica y la cantidad de radiación absorbida por el analito es medida, esto resulta en un espectro de absorción resultado de la interacción de la radiación electromagnética con el analito.

La técnica UV-Vis se basa en el fenómeno de absorción de la luz, la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la solución, a medida que la cantidad de analito aumenta la absorción incrementa

linealmente en la región UV-Vis la absorción de radiación depende de la configuración electrónica de las especies absorbentes como lo son los átomos, moléculas, iones o complejos, la cantidad de radiación absorbida por el analito es medida y graficada contra la longitud de onda del espectro electromagnético con fin de obtener el espectro, un espectro UV-Vis típico es una gráfica de la longitud de onda o frecuencia contra la intensidad de absorción como se muestra en la Figura 75.

El UV-Vis se basa en la ley de absorción de Beer-Lambert la cual describe una relación lineal entre la absorbancia de la luz y la concentración de las especies absorbentes, esta ley se expresa de la siguiente forma:

$$A = \epsilon lc$$

Donde ϵ es la absorptividad de las especies atenuantes, l es la longitud de camino óptico y c es la concentración de las especies atenuantes.

Los componentes básicos de un UV-Vis (Figura 74) es una fuente de luz policromática que pasa a un monocromador para dispersar la radiación policromática de acuerdo a su longitud de onda, las celdas de UV-Vis están específicamente diseñadas para el análisis espectrofotométrico, varían con respecto a forma, tamaño, longitud de camino óptico, estas celdas están hechas de plástico, vidrio, o cuarzo de grado óptico que no absorbe la longitud de onda de interés, una vez que la radiación electromagnética pasa por la celda de análisis está pasa a un detector que mide la cantidad de luz que pasa por la muestra y convierte la señal lumínica en señales eléctricas [125].

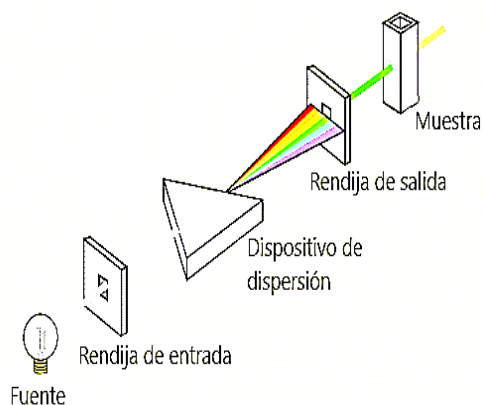


Figura 74 Diagrama de un espectrofotómetro de UV-Vis.

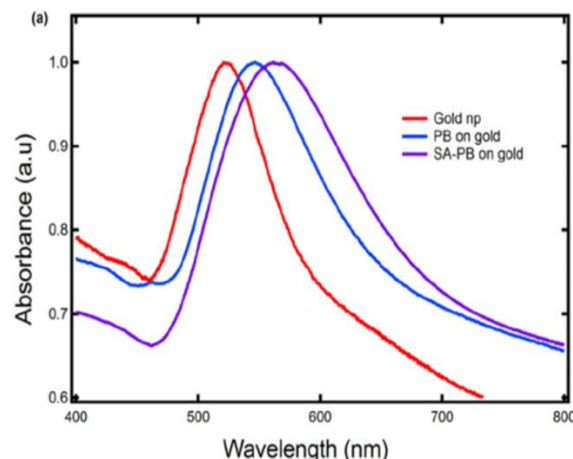


Figura 75 Espectro UV-Vis de nanopartículas de oro.

10.3. Determinación de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante.

10.3.1. Determinación de capacidad oxidante mediante el reactivo DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl) -1- picrylhydrazyl)

El descubrimiento de la radicales “estables” es considerado uno de los mayores avances de la química orgánica, el radical DPPH• es usado primariamente como estándar de calibración en la espectroscopia electrónica paramagnética, y se convirtió en el reactivo más usado para los estudios in vitro de la actividad carroñera de radicales en compuestos individuales, mezclas, naturales o sintéticas, el ensayo colorimétrico se convirtió en una herramienta universal para evaluación de la actividad oxidante en compuestos de naturaleza fenólica.

En solución (típicamente metanol o etanol) el DPPH• absorbe intensamente en la región visible (513-528) nm, su color morado intenso (Figura 76) se debe al electrón no apareado y su deslocalización parcial de la densidad de rotación a través del sistema conjugado de los anillos aromáticos.

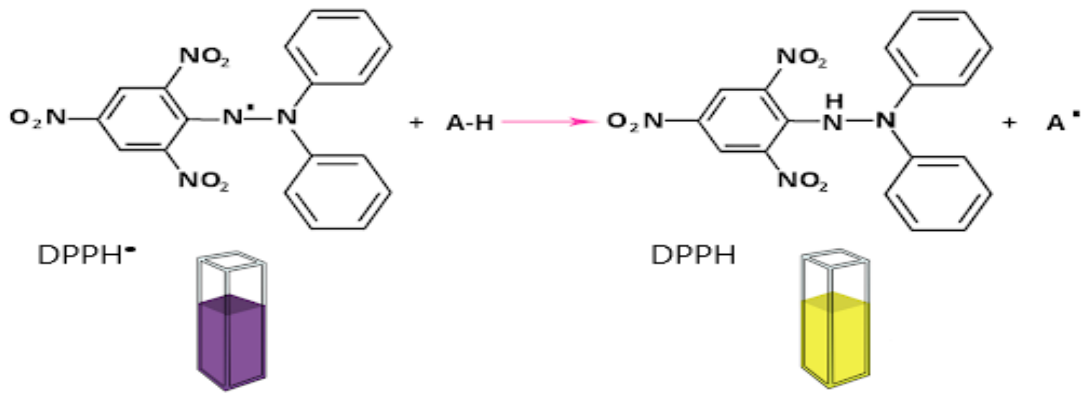


Figura 76 Reducción del radical DPPH• por medio de una molécula antioxidante.

La estructura de este radical genera la posibilidad de aceptar un electrón o átomo de hidrogeno para convertirse en un compuesto diamagnético estable, los donadores (carroñero de radicales), los cuales presentan propiedades antioxidantes in vitro puedes ejercer actividades in vivo, la reducción de la concentración de radical genera una reducción en la absorbancia pasando la solución de un color morado a un color amarillo.

Antioxidantes primarios, como fenoles, aminas aromáticas, fenotiazinas, piridinoles, pirimidinoles y los tioles pueden eliminar los radicales libres como el radical peroxilo a través de donación de átomos de hidrógeno, sin embargo, estudios han demostrado que los fenoles contribuyen a una transferencia de electrones [126].

10.3.2. Determinación de flavonoides mediante el reactivo ácido 2-aminoetildifenilborónico (DPBA)

Los flavonoides ha mostrado tener un rol en la interacción de las plantas con agentes inductores de estrés, estos compuesto por lo general absorben entre los 250-360 nm, el método más popular para analizarlos consiste en la medida de la fluorescencia de los flavonoides cuando estos son teñidos con el ácido 2-aminoetildifenilborónico (Figura 78), después de que el tejido de una planta es

teñido con el DPBA, la excitación con UV o luz azul induce una señal fluorescente que ha sido atribuida a complejos de compuesto flavonoides. Excitación azul combinada con la detección de fluorescencia de verde a amarillo-naranja se ha convertido en el estándar para la detección de flavonoides sin la mínima interferencia de otros compuestos.

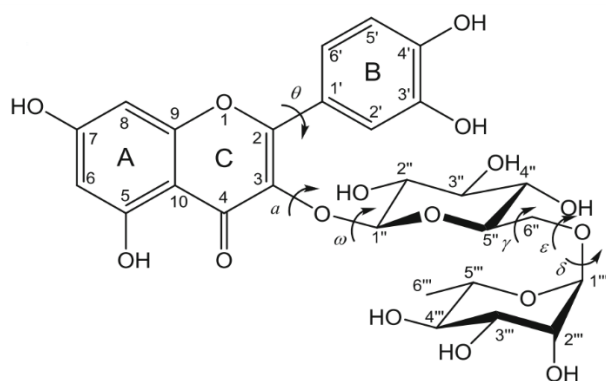


Figura 77 Reducción del radical DPPH• por medio de una molécula antioxidante.

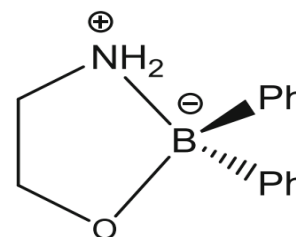


Figura 78 Reducción del radical DPPH• por medio de una molécula antioxidante.

El complejo más investigado es compuesto de DPBA y rutina la cual es usado como un flavonoide representativo (Figura 77), la rutina (3-ramnoglucósido quercetina), es un flavonoide con alta capacidad antioxidante y otros efectos beneficios en los seres humanos.

10.3.3. Determinación de fenoles por medio de la técnica Folin-Ciocalteu

Las reacciones colorimétricas son altamente usadas para el análisis espectrofotométrico de UV-Vis, de las sustancias referencia más usadas para el análisis colorimétrico es el ácido gálico. Este método mide la concentración de los grupo hidroxilo fenólicos en los extractos de plantas como lo es el ácido gálico (Figura 79), los polifenoles en los extractos reaccionan con agentes redox específicos como el reactivo Folin-Ciocalteu (FC) formando un complejo de color

azul (Figura 80) que puede ser cuantificado por medio de la técnica UV-Vis, la reacción forma un cromoforo azul constituido por un complejo fosfomolibdeno-fosfotúngstico, a este compuesto se le añade sales de litio las cuales evitan turbidez en la solución facilitando el análisis espectrofotométrico, cuyo máximo de absorción depende de la solución alcalina y la concentración de compuestos fenólicos [127].

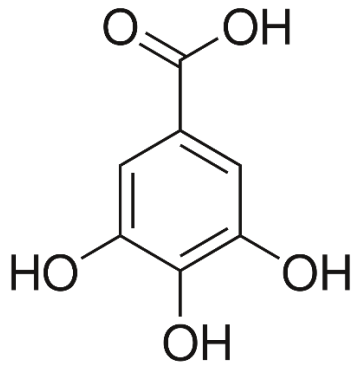


Figura 79 Molécula de ácido gálico.

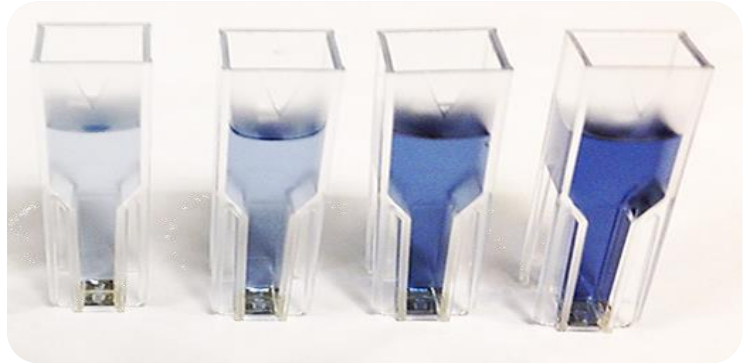


Figura 80 Ensayo de Folin-Ciocalteu, la coloración azul aumenta a mayores concentraciones de radicales hidroxil fenólicos.