



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ingeniería

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE
TiO₂ SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA EN LA
RIZOSFERA DE PLANTAS DE ESTEVIA (*Stevia
rebaudiana*)**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO EN
NANOTECNOLOGÍA

Axel Eduardo García Ovando

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Karen Esquivel Escalante (FI)

Codirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez (FCN)

Santiago de Querétaro, Qro.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación del efecto de nanopartículas de TiO₂ sobre
la comunidad microbiana en la rizosfera de plantas de
estevia (*Stevia Rebaudiana*)

por

Axel Eduardo García Ovando

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

Clave RI: IGLIN-280906



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de ingeniería
 Ingeniería en nanotecnología



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE TIO₂ SOBRE LA
 COMUNIDAD MICROBIANA EN LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE ESTEVIA (*Stevia
 rebaudiana*)**

T E S I S

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

Presenta

Axel Eduardo García Ovando

Dirigida por

Dra. Karen Esquivel Escalante (FI)

Codirigida por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez (FCN)

SINODALES

Dra. Karen Esquivel Escalante	_____
Presidente	
Dr. José Antonio Cervantes Chávez	_____
Secretario	
Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez	_____
Sinodal	
Dr. Luis Alejandro Chávez Martínez	_____
Sinodal	

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Agosto, 2023

México

Resumen

En los últimos años, el creciente uso de las nanopartículas ha llevado a cabo diferentes estudios para evaluar el riesgo que pudieran ocasionar al entrar en contacto con diversos sistemas biológicos, ocasionando así múltiples efectos toxicológicos, sin embargo, estos efectos pueden llegar a ser aprovechados para mejorar las propiedades fisiológicas y la capacidad de producción en diversas especies de plantas, obteniendo como resultado final una mejoría de sus nutrientes y una mayor producción para el consumo humano.

En el presente trabajo se muestran los efectos de exposición de estevia (*Stevia Rebaudiana*) ante las nanopartículas de TiO_2 , las cuales se sintetizaron por medio de la técnica sol-gel. La estevia se expuso a 2 diferentes concentraciones (5 y 10 ppm) durante un periodo de 6 semanas con el objetivo de observar si existían cambios fisicoquímicos en estas en comparación con el control, además de analizar los efectos del TiO_2 en las rizobacterias promotoras del crecimiento durante un periodo de 3 semanas.

Las nanopartículas fueron posteriormente caracterizadas por las técnicas SEM, TEM, XRD y la espectroscopía Raman, mientras que el análisis de los efectos toxicológicos se evaluó con la medición de los parámetros biológicos como el tamaño del tallo y algún cambio de coloración en las hojas, concentración de clorofila, carotenoides y la capacidad de inhibición de los radicales DPPH y ABTS. Mientras que la capacidad antimicrobiana del TiO_2 se estudió por medio de los experimentos microbiológicos pertinentes.

La interacción de la estevia con las nanopartículas de TiO_2 significó un aumento en el tamaño del tallo y la altura de las plantas, además de un aumento a largo plazo de clorofila además de la capacidad de inhibición de los radicales libres. En el ámbito microbiológico, no se mostró ningún efecto significativo al hacer interactuar las rizobacterias con el TiO_2 hasta antes de aplicar un agente externo (luz UV).

Palabras clave: Nanotoxicología, dióxido de titanio, rizosfera, estevia, metabolitos secundarios.

Abstract

In recent years, the increasing use of nanoparticles has led to different studies to evaluate the possible risk that these could cause when in contact with various biological systems, thus causing multiple toxicological effects, however, these possible effects can be used to improve the physiological properties and production capacity in various plant species, obtaining as a final result a higher production and a product with better properties for human consumption.

The present work shows the effects of exposure of stevia (*Stevia Rebaudiana*) to TiO₂ nanoparticles, which were synthesized using the Sol-Gel technique. The stevia was exposed to 2 different concentrations (5 and 10 ppm) for a period of 6 weeks in order to observe if there were physicochemical changes in these compared to the control, in addition to observing the effects of TiO₂ on the growth-promoting rhizobacteria for a period of 3 weeks. The experiment was set up to know if there was a toxicological effect depending mainly on the concentration applied.

The nanoparticles were further characterized by SEM, TEM, XRD and Raman spectroscopy techniques, while the evaluation of toxicological effects was assessed by measuring biological parameters such as stem size and some coloration change in leaves, chlorophyll concentration, carotenoids and DPPH & ABTS radical inhibition ability. While the antimicrobial capacity of TiO₂ was evaluated by relevant microbiological experiments.

The interaction of stevia with TiO₂ nanoparticles meant an increase in stem size and plant height, in addition to a long-term increase in chlorophyll in addition to free radical inhibition capacity. At the microbiological level, no significant effect was shown by interacting rhizobacteria with TiO₂ until before applying an external agent (UV light).

Key words: Nanotoxicology, titanium dioxide, rhizosphere, stevia, secondary metabolites.

Dedicatoria

A mi familia, amigos y profesores que me dieron su apoyo para seguir adelante.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, por todo el apoyo que me brindaron y por ayudarme con todo lo que estaba en sus manos, todo lo que he logrado es gracias a ustedes.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a los profesores que me impartieron clases para compartirme sus conocimientos y ayudarme en cualquier duda que tenía, además de otorgarme asesorías y sus consejos para aprovechar al máximo esta etapa.

Al laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales y a la Dra. Karen Esquivel Escalante por darme la oportunidad de estar en el grupo de trabajo, lo cual ha sido una gran experiencia para mí y por supuesto a todos los miembros del grupo de trabajo, los cuales siempre han estado al tanto de mi avance y buscaron la manera de apoyarme en este proyecto.

Al laboratorio de metabolitos secundarios y a la Dra. Angélica Feregrino, por prestarme sus instalaciones, materiales y equipos, además de proporcionarme constante capacitación.

Al laboratorio de microbiología molecular y al Dr. Antonio Cervantes, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme su apoyo, capacitación y conocimiento en el área de microbiología.

Por último, a mis amigos de generación, con los cuales nos hemos apoyado desde primer semestre de la carrera con cualquier proyecto o tarea y por supuesto, brindando apoyo emocional.

Contenido

1	Introducción	10
2	Antecedentes	13
2.1	Nanopartículas	13
2.2	Dióxido de Titanio (TiO ₂).....	14
2.3	Nanoagricultura.....	16
2.4	Nanotoxicología.....	16
2.5	Rizosfera.....	19
2.6	Rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR's)	20
2.7	Estevia (Stevia rebaudiana L.).....	21
2.8	Metabolitos secundarios	22
2.9	Actividad Antioxidante	22
2.10	Carotenoides	23
3	Justificación y descripción del problema	23
4	Hipótesis y objetivos	24
4.1	Hipótesis.....	24
4.2	Objetivo General	24
4.3	Objetivos específicos	24
5	Metodología.....	26
5.1	Síntesis y caracterización de nanopartículas de TiO ₂	26
5.2	Pruebas <i>in vitro</i>	26
5.2.1	Exposición a luz UV.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2.2	Pruebas <i>In vivo</i>	29
5.2.3	Determinación de capacidad antioxidante por DPPH (2-2-difenil-1-1-picrihidrazil) .	30
5.2.4	Determinación de capacidad antioxidante por ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-acido sulfónico).....	32
5.2.5	Determinación de clorofila	32
6	Resultados.....	33
6.1	Caracterización del dióxido de titanio (TiO ₂) obtenido por Sol-Gel	33
6.1.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	33
6.1.2	Microscopía electrónica de Transmisión (TEM).....	33
6.2	Difracción de rayos X (XRD)	34
6.3	Espectroscopía Raman	35

6.4	Pruebas <i>in vitro</i>	37
6.4.1	Suelo recuperado de plantas de Estevia	37
6.4.2	Minimacetas	38
6.4.3	Exposición de minimacetas a luz UV	39
6.5	Pruebas <i>in vivo</i>	41
6.5.1	Altura de las plantas	41
6.5.2	Capacidad antioxidante	43
6.5.3	Determinación de Clorofila y Carotenoides	44
7	Conclusiones	45
8	Perspectivas	47
9	Referencias.....	48
10	Anexos.....	55
10.1	Plantas de estevia.....	55
10.2	Curvas de calibración de Trolox.....	58
10.3	Capacidad Antioxidante.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de NMS según sus dimensiones.	14
Figura 2. Ilustración química 2D del Dióxido de Titanio.	15
Figura 3. Proceso de muerte celular debido a la interacción con nanopartículas.	16
Figura 4. Aplicación de las nanopartículas a la planta.	18
Figura 5. Proceso de experimentación para minimacetos.	27
Figura 6. Diluciones expuestas a luz UV.	28
Figura 7. Invernadero.	29
Figura 8. Maceta de Estevia.	29
Figura 9. Oxidación del radical DPPH.	30
Figura 10. Determinación de clorofila	32
Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por el método Sol-Gel.	33
Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por el método Sol-Gel.	34
Figura 13. Patrón de difracción de rayos X de nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por Sol-Gel.	35
Figura 14. Espectro Raman de las nanopartículas de TiO ₂ sintetizadas por el método Sol-Gel.	36
Figura 15. Sembrado de diluciones, a),c) Placas grupo B, b),d) Placas grupo C.	37
Figura 16. Sembrado de diluciones de control, panthoea antophila y pseudomonas mediterránea.	39
Figura 17. Sembrado de dilución D3 antes y después de exposición a luz UV durante 7 minutos.	40
Figura 18. Sembrado de dilución C2 antes y después de exposición con luz UV durante 15 minutos.	41
Figura 19. Comparación de altura con los diferentes tratamientos.	42
Figura 20. Plantas de estevia en su última semana de tratamiento.	42
Figura 21. Capacidad Antioxidante: a) DPPH, b) ABTS.	43
Figura 22. Concentración de clorofila.	44
Figura 23. Concentración de carotenoides.	45
Figura 24. Plantas control a lo largo del tratamiento.	55
Figura 25. Plantas tratadas con 5 ppm.	56
Figura 26. Plantas tratadas con 10 ppm.	57
Figura 27. Curvas de calibración de Trolox, a) DPPH, b) ABTS	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Volúmenes de trolox y metanol para realizar la curva de calibración.	31
Tabla 2. Número de UFC antes del tratamiento del suelo de cada planta.	37
Tabla 3. Número de UFC de las placas, siendo los grupos; a) control, b) control Panthoea Antophila, c) control Pseudomonas Mediterránea, d) Panthoea + TiO2 5 ppm, e) Panthoea + TiO2 10 ppm, f) Pseudomonas + TiO2 ppm, g) Pseudomonas + TiO2 10 ppm.	38
Tabla 4. Número de UFC en 7 minutos sobre la exposición con luz UV.....	40
Tabla 5. Número de UFC pasados 15 minutos de exposición a luz UV.	41
Tabla 6. Resultados de la capacidad antioxidante por DPPH S1.	58
Tabla 7. Resultados de la capacidad antioxidante por DPPH S3.	58
Tabla 8. Resultados de la capacidad antioxidante por DPPH S6.	59
Tabla 9. Resultados de la capacidad antioxidante por ABTS S1.....	59
Tabla 10. Resultados de la capacidad antioxidante por ABTS S3.....	59
Tabla 11. Resultados de la capacidad antioxidante por ABTS S6.....	60

1 Introducción

La nanotecnología se basa en la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la materia en la escala atómica o molecular, con el objetivo de poder mejorar o encontrar diversas propiedades que puede presentar un material para nuevas aplicaciones, las cuales se pueden ser en distintas áreas, como lo son la medicina, agricultura, electrónica o en los alimentos [1].

La investigación sobre el uso de nanomateriales (NMs) en el ámbito biológico avanza constantemente, impulsada principalmente por su amplia variedad de características, como el tamaño de partícula y la morfología, lo que los convierte en una prometedora opción para mejorar los niveles de producción de nutrientes y abordar los problemas que enfrentan el desarrollo de la agricultura actualmente [1][2].

Hoy en día, los científicos agrícolas se enfrentan a una amplia gama de problemas como el estancamiento en el rendimiento de los cultivos, la baja eficiencia en el uso de nutrientes, la disminución de la materia orgánica del suelo, las deficiencias de múltiples nutrientes, el cambio climático, la disminución de la superficie agrícola, la baja disponibilidad de agua para riego y la escasez de mano de obra; además del éxodo de personas desde las áreas agrícolas a las ciudades. A pesar de esas enormes dificultades que enfrenta el sector agrícola, es necesario mantener un crecimiento sostenido del 4% para afrontar la demanda de alimentos a nivel global [3].

Otra problemática referente a los cultivos, son las enfermedades en las plantas, que se entienden como una interacción entre el huésped (planta), el patógeno y el ambiente. Esto provoca cambios fisiológicos y morfológicos no deseados que, a su vez, resultan en pérdidas estimadas del 30 % al 40 % de la producción de cultivos cada año. Entre las causas de esta problemática se destacan los monocultivos, el uso irracional de pesticidas, el calentamiento global y la falta de variedades resistentes [4].

Así mismo, la enfermedad de las plantas se considera como respuestas de las células y tejidos a un factor infectivo y ocasiona afectaciones metabólicas, lo cual implica disminución en rendimientos y calidad de la producción. Los daños son causados por plagas que incluyen hongos, bacterias, virus, insectos, nematodos, viroides y oomicetos, los cuales son la mayor amenaza en la seguridad alimentaria [4].

Es por esto por lo que los NMs han surgido como una alternativa para su aplicación en agricultura, debido a la alta relación de área superficial, propiedades fisicoquímicas, mecánicas y electrónicas únicas en relación con sus contrapartes a macroescala. [5] Los NMs son conocidos por poseer cierta toxicidad, pero aún no se conocen las posibles consecuencias de su exposición con sistemas biológicos, esto se debe a que los NMs tienen una superficie mucho mayor que los materiales de tamaño micrométrico, lo que les permite interactuar con las células y los tejidos de manera diferente.[6] Cada vez más NMs se han aplicado con éxito en la producción agrícola y la gestión para la

mejora de la biodisponibilidad de los nutrientes del suelo y la calidad de los alimentos en los últimos 10 años [5].

Los NMs como nanofertilizantes, tienen como objetivo principal el lograr la introducción selectiva y controlada de diversos nutrientes esenciales para el desarrollo de los cultivos. [7] De igual forma se encuentran los nanosensores, los cuales son instrumentos con los que se puede analizar y medir concentraciones a los que se someten los productos agrícolas para poder tener las condiciones óptimas de cultivo. Por último, los nanopesticidas, que presentan menores efectos nocivos en los cultivos y en el medio ambiente, además de poder incrementar la solubilidad en agua, un mejor control sobre patógenos, hierbas e incluso insectos sobre los cultivos [8][9]. Gracias a sus propiedades únicas, los NMs pueden influir de manera más efectiva en las actividades metabólicas de las plantas en comparación con los materiales convencionales. Además, poseen el potencial de movilizar los nutrientes nativos presentes en la rizosfera, lo que contribuye a un mejor aprovechamiento de los recursos disponibles para el crecimiento de las plantas [7].

Varios investigadores han reportado que el uso de estos NMs pueden presentar ventajas en el desarrollo de cultivos de consumo humano como el maíz, lechuga, tomate, trigo, entre otros. Sin embargo, a pesar de que se encontraron efectos positivos en la introducción de los NMs en estos cultivos, se deben tener ciertas precauciones con la interacción de estos materiales con otras especies y su introducción en la cadena alimenticia [10].

Dentro de estos NMs, se encuentra el dióxido de titanio (TiO_2), el cual es uno de los nanomateriales más producidos gracias a sus propiedades fotocatalíticas, con una producción anual de hasta 38,000 toneladas métricas en Estados Unidos, y se espera que su producción alcance los 2.5 millones de toneladas métricas en 2025. [11] Sus aplicaciones varían desde celdas solares hasta la eliminación fotocatalítica de contaminantes persistentes [11]. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que estas propiedades podrían ocasionar efectos tóxicos en distintos organismos, lo que desempeña un papel crucial en la elicitación de diversos grupos de plantas [12].

El TiO_2 tiene actividad antibacteriana que, podría tener efectos nocivos en la rizosfera y la microbiota del suelo.[7] La rizosfera, una parte crucial del ecosistema de la planta, es un área donde se establece una interacción dinámica con los microorganismos y donde las características químicas y biológicas se manifiestan en una delgada porción de apenas 1 mm alrededor de las raíces.[11] Los microorganismos presentes en el suelo desempeñan funciones esenciales para el mantenimiento de la vida vegetal, ya que participan en el reciclaje de elementos, la descomposición de materia orgánica y promueven el crecimiento de las plantas, lo que a su vez contribuye significativamente a la productividad vegetal [11].

Por otro lado, por tratarse de una zona de actividad biológica intensa, con una transferencia importante de agua y nutrientes, generalmente los microorganismos, son

encontrados en mayor número y diversidad, si se le compara con el suelo no rizosférico [13].

En este proyecto se trabajó con cultivos de estevia (*Stevia rebaudiana*), una planta medicinal con gran importancia en la actualidad. La estevia es el segundo edulcorante con mayor consumo a nivel mundial, y sus extractos de diterpenoides glicósidos de esteviol son 300 veces más dulces que el azúcar tradicional. Debido a estas características, es alta la demanda de producción de la planta [14].

Adicionalmente, la estevia posee propiedades antibacterianas y antifúngicas, mostrando efectividad contra bacterias como *Entamoeba coli*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium diphtheriae*, así como contra el hongo *Candida albicans*. [14] Sin embargo, aún no se disponen de datos claros acerca de los posibles efectos que el TiO_2 pueda tener en el desarrollo de la planta mediante su interacción con la rizosfera, ni de los posibles efectos antimicrobianos del TiO_2 en bacterias beneficiosas para el crecimiento. Por ende, se plantea como objetivo realizar un estudio para abordar estas cuestiones.

Es por esto, que este trabajo se enfocó en conocer los efectos tanto positivos como negativos del TiO_2 en el cultivo de estevia (*Stevia R.*) por medio de la evaluación de la producción de clorofila, metabolitos secundarios, actividad antioxidante y, por otro lado, conocer si el TiO_2 puede afectar directamente a las plantas promotoras de crecimiento, ubicadas en la rizosfera.

2 Antecedentes

2.1 Nanopartículas

Los nanomateriales pueden ser clasificados dependiendo del número de dimensiones las cuales se encuentren dentro de la escala nanométrica, como se muestra en la Figura 1. Existen 4 clasificaciones según sus dimensiones, dentro de la clasificación 0D (cero dimensional) todas las dimensiones se encuentran dentro del rango de 1-100 nm, como lo son los clusters, mientras que los nanotubos y fibras pertenecen a la clasificación 1D debido a que una de sus dimensiones (largo) sobrepasa el rango de 1-100 nm, de igual forma, los materiales como películas o recubrimientos son parte de la clasificación 2D debido a que el largo y ancho de estos sobrepasan los 100 nm, por último se encuentran los materiales 3D, en los que las 3 dimensiones sobrepasan los 100 nm. [15] Las nanopartículas son materiales con una longitud que va entre 1-100 nm en al menos una de sus dimensiones, aunque mayormente se definen como aquellas que están dentro del rango de 1-100 nm [16].

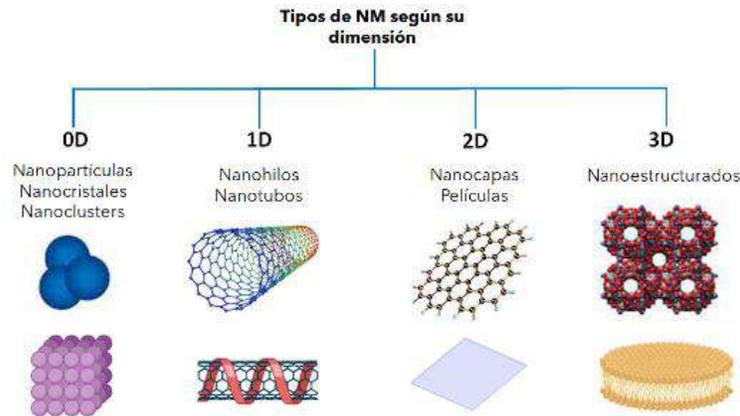


Figura 1. Clasificación de NMS según sus dimensiones.

Las nanopartículas pueden organizarse también en 4 distintas categorías dependiendo de su obtención:

Los **nanomateriales obtenidos con base en carbón**, se obtienen a partir de las estructuras alotrópicas del carbón, formando fullerenos y grafeno, entre otros [17].

Los **nanomateriales inorgánicos**, que incluyen a las nanopartículas metálicas, los óxidos metálicos y semiconductores, además de los puntos cuánticos, se utilizan en optoelectrónica, catálisis y medicina [18].

Los **nanomateriales orgánicos**, que se basan en las interacciones no covalentes para el autoensamblaje y diseño de moléculas que puedan adoptar estructuras como dendrímeros o liposomas, se utilizan principalmente en medicina y alimentos [19].

Los **compositos**, los cuales están hechos por la combinación de múltiples materiales en la nanoescala, estos pueden ser metálicos, orgánicos, poliméricos o cerámicos y se pueden aplicar en cualquier área [20].

2.2 Dióxido de Titanio (TiO₂)

Entre los nanomateriales inorgánicos, destacan los semiconductores, que han sido objeto de estudio a través de los años, entre los distintos tipos de semiconductores fotocatalíticos se encuentra el dióxido de titanio (TiO₂), que se ha consolidado como uno de los NMs más utilizados que se aplica en textiles, pinturas, fertilizantes, papel, plásticos, alimentos y cosméticos. [21] El TiO₂ se forma por enlace iónico de dobles enlaces entre titanio con dos oxígenos, como se aprecia en la Figura 2. Es un material semiconductor tipo n, químicamente inerte, que también presenta actividad fotocatalítica en presencia de luz con una energía igual o superior a su energía de banda prohibida [22].



Figura 2. Ilustración química 2D del Dióxido de Titanio.

La actividad fotocatalítica comienza con la absorción de un fotón ($h\nu$) con una energía igual o mayor a la de su banda prohibida, produciendo así un par electrón-huevo en la superficie de la nanopartícula de TiO_2 , de manera que el electrón es promovido a la banda de conducción (BC) mientras que un hueco de carga positiva es formado en la banda de valencia (BV), generando así que 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 [23].

El TiO_2 presenta 3 fases cristalinas, cada una con una energía de banda prohibida de distinto valor, siendo anatasa (3.0 eV) la más usada, rutilo (3.2 eV) y brookita (3.3 eV) [24][25].

Como material nanoestructurado, el TiO_2 tiene propiedades únicas, que hacen posible que se utilice en varios campos de la ciencia y tecnología incluyendo la microbiología, nanobiotecnología y medicina.[21] El dióxido de titanio es un semiconductor que absorbe radiación en la región UV, que se utiliza como pigmento blanco, recubrimiento anticorrosivo, sensor de gases, absorbente de rayos UV en productos cosméticos y de manera general en la industria cerámica. Además, constituye un óxido estable y no tóxico que puede tener aplicaciones ambientales [26].

Los efectos tóxicos de TiO_2 sobre las plantas y las células animales han sido demostrados en múltiples estudios.[24] Por lo tanto, comprender los efectos inducidos por las nanopartículas de TiO_2 en los organismos individuales y los mecanismos de su acción es de gran importancia para evaluar el riesgo medioambiental [27].

El conocimiento que existe sobre los efectos de las nanopartículas TiO_2 en sistemas biológicos se basa en que las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan en la superficie del TiO_2 durante su actividad fotocatalítica, como se puede observar en la Figura 3. Al entrar en contacto con los microorganismos, las nanopartículas pueden causar la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana de las células, interrumpiendo así su respiración celular [28].

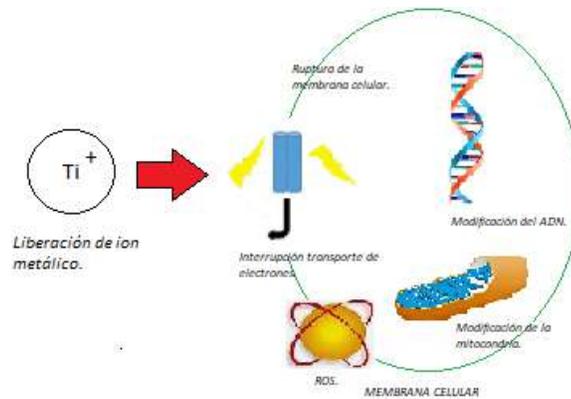


Figura 3. Proceso de muerte celular debido a la interacción con nanopartículas.

2.3 Nanoagricultura

La nanotecnología ha pasado a formar parte de la humanidad, y más en la última década. Con el avance de las herramientas para visualizar y manipular estas diminutas estructuras, los nanomateriales (NMs) han penetrado inevitablemente en todos los aspectos de la vida humana, empezando por los tejidos, hasta llegar a aplicaciones más complejas como en las industrias aeroespacial, agrícola, alimenticia, automovilística, biomédica y ambiental [29].

Ha surgido como un avance tecnológico-científico que puede transformar sectores de la agricultura proporcionando herramientas novedosas para la detección molecular de estrés biótico, siendo este causado por la acción de otros seres vivos; animales, microorganismos, virus e incluso otras plantas [30], además del estrés abiótico, refiriéndose este a los factores ambientales que alteran los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas, considerándose la causa central de la pérdida de más de 50% de los principales cultivos en el mundo, así como la reducción del crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos. [31] Así como para la detección rápida de enfermedades producidas por fitopatógenos y el mejoramiento en la capacidad de las plantas para absorber el agua, los nutrientes y los pesticidas [32].

Se están llevando a cabo estudios sobre varias nanopartículas metálicas, como el cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn), plata (Ag), titanio (Ti), entre otras. Estas nanopartículas han encontrado aplicaciones en la agricultura e industria alimentaria debido principalmente a su actividad antimicrobiana. Por otro lado, los óxidos metálicos, como el óxido de cobre (CuO), óxido de grafeno (OG), óxido de hierro (Fe₂O₃) y dióxido de titanio (TiO₂), se emplean en la agricultura para funciones como pesticidas, fertilizantes, antibióticos y nutrientes [26].

2.4 Nanotoxicología

Las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales son importantes tener a consideración al hablar de los efectos posibles que pueden tener los nanomateriales al interactuar con sistemas biológicos. Sin embargo, con los organismos del reino vegetal,

esto puede traer ciertas ventajas, las plantas al estar sometidas bajo un tipo de estrés físico o bioquímico suelen modificar sus rutas metabólicas para generar productos secundarios con propiedades que puedan contrarrestar los efectos negativos a los que las plantas son expuestas, siendo estos los metabolitos primarios y secundarios. Se ha demostrado que el consumo de estos metabolitos puede generar beneficios a la salud, además de proporcionar un valor agregado a los productos obtenidos de las plantas [33,34].

Las aplicaciones foliares de los diversos NMs mediante el sistema de riego pueden provocar fitotoxicidad, así como afectar el suelo y el agua debido a su bioacumulación, por lo que se debe tener en cuenta cuales son las dosis óptimas y frecuencia de aplicación en las plantas. Los mecanismos de nanotoxicidad siguen siendo desconocidos, sin embargo, están estrechamente relacionados con la dosis el tamaño de partícula, la morfología, su área superficial y su estructura cristalina.[35] De acuerdo con diversos estudios toxicológicos, la toxicidad de los NMs depende varios factores, como:

- **Dosis:** Relaciona el número de nanopartículas que penetran las células en un tiempo correspondiente, que se basa en la concentración molar en el medio [36].
- **Tamaño de partícula:** El tamaño ha demostrado tener influencia en los diferentes efectos toxicológicos, debido a que tamaños más pequeños pueden atravesar distintos tipos de tejidos [37].
- **Morfología:** Los NMs pueden adoptar diversas formas; esferas, cubos, estrellas, fibras, tubos o picos, entre otros. Siendo este factor el que pueda modificar las propiedades de las nanopartículas y las propias interacciones con los organismos vivos [38].
- **Área superficial:** La toxicidad aumenta al disminuir el tamaño de partícula y al aumentar su área superficial, permitiendo así que se tengan un mayor número de sitios activos a comparación con las nanopartículas de mayor tamaño [39].
- **Estructura cristalina:** La fase cristalina en la que se encuentren les puede conferir propiedades únicas, las cuales pueden generar diversos efectos toxicológicos dependiendo de la fase del material [40].

En la Figura 4 se observan las posibles aplicaciones de los NMs hacia las plantas, siendo la primera la incorporación de estas al suelo

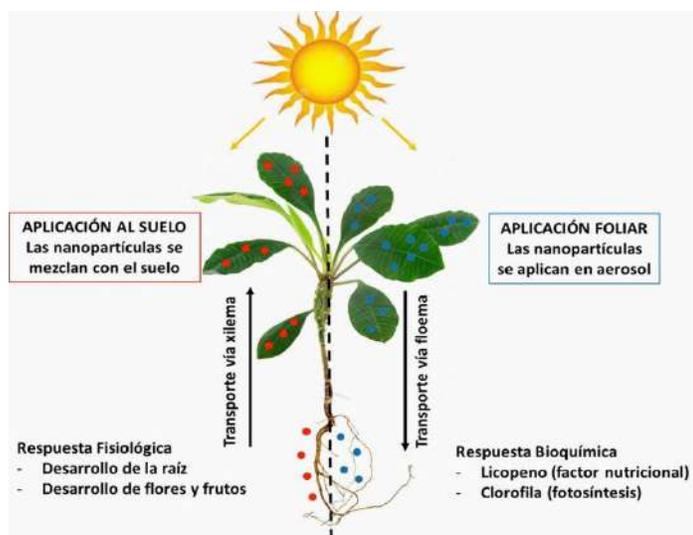


Figura 4. Aplicación de las nanopartículas y su efecto en la planta.

El dióxido de titanio (TiO_2) se considera un material inerte y seguro y se ha utilizado en muchas aplicaciones durante décadas. El TiO_2 está incluido dentro de la clase 1 en la lista de la FDA (*food & drug administration*) de ingredientes activos aceptables en productos estéticos y alimenticios [41].

La investigación sobre los efectos del TiO_2 en plantas es cada vez mayor, y se han realizado esfuerzos para comprender los resultados de la aplicación de TiO_2 en las plantas y la toxicidad en el medio ambiente. El TiO_2 presenta una naturaleza dual de consecuencias tanto beneficiosas como tóxicas, dependiendo de muchos factores experimentales como la dosis o el tiempo de exposición [42].

Asadi et al. (2022) realizó un estudio sobre *Ziziphora clinopodioides Lam.* Que ha demostrado que el TiO_2 tiene un alto potencial para interactuar con el ADN y causar daños en las células del meristemo de la raíz tras 18 horas de exposición. Los resultados del ensayo revelaron que el daño al ADN se produjo de manera dependiente de la dosis, pero el daño fue significativo sólo en el caso de la concentración más alta (120 ppm) de nanopartículas de un tamaño de 21 nm, mientras que todas las concentraciones de partículas del tamaño de 50 nm produjeron un daño estadísticamente significativo [43].

En el caso de las NPs de TiO_2 de 21 nm, se observó el requerimiento de una dosis genotóxica significativamente mayor en comparación con las TiO_2 NPs de 50 nm. Esto contrasta con la creencia previa de que las partículas de menor tamaño son más peligrosas debido a su mayor capacidad de permeabilidad. Además, un ensayo generalizado de especies reactivas de oxígeno (ROS) demostró un aumento en la producción de ROS de manera dependiente de la concentración, lo cual se correlacionó con los datos de captación e internalización de las NPs. La toxicidad se atribuyó a este incremento en ROS y al consiguiente estrés oxidativo [43].

Un estudio realizado por Servin et al. (2013) ha evidenciado la presencia de estrés oxidativo en los frutos de *Cucumis sativus L.* (pepino) después de cultivar las plantas en suelo tratado con TiO_2 . Durante un período de 150 días de cultivo en un suelo arenoso, consiguiendo niveles más elevados de peróxido de hidrógeno, además de un aumento en la actividad del ensayo de catalasa en todas las concentraciones de TiO_2 utilizadas. Sin embargo, se detectó una disminución en la actividad del ensayo de ascorbato peroxidasa.

Se concluyó que las dosis tóxicas de TiO_2 en el suelo causaron estrés en las plantas de pepino, ya que la actividad de la catalasa aumentó de manera constante, mientras que la actividad del ascorbato peroxidasa disminuyó. Esto indica que el TiO_2 puede inducir un desequilibrio en el sistema antioxidante de las plantas. Es importante destacar que este estudio señala la importancia de evaluar cuidadosamente las dosis y efectos potenciales de TiO_2 en el suelo, ya que el estrés oxidativo puede afectar negativamente el desarrollo y la salud de las plantas cultivadas en esas condiciones [44].

2.5 Rizosfera

Casi todos y cada uno de los tejidos de las plantas están colonizados por microbioma específico, que contribuye al crecimiento la salud y la forma física de sus huéspedes. Así, las plantas y los microorganismos asociados establecen una relación mutualista [45].

Una parte importante para el desarrollo correcto de las plantas es la rizosfera, la cual ha sido definida como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo con el tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores. La abundancia de bacterias en la rizosfera en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y la habilidad que presentan de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono y/o nitrógeno. Dada su abundancia, el componente microbiano del suelo es importante para la salud de los ecosistemas. La composición de esta microfauna se ve influida por la deposición de sustancias mucilaginosas y exudados radiculares [46].

Los exudados radiculares no sólo rigen la composición del fitomicrobioma, sino que también determinan las propiedades físicas y químicas del suelo, evitan la herbivoría y alivian las asociaciones simbióticas. La composición del microbioma de una especie vegetal sigue siendo la misma, aunque se cultive en distintos ecosistemas. Indicando así, que las plantas pueden alterar y cambiar el fitomicrobioma que las rodea de manera muy eficiente en virtud de diversas señales químicas [47].

Las plantas proporcionan hábitat a comunidades microbianas como la rizosfera, la filosfera y la endosfera. A cambio, los microbios asociados estimulan la germinación de las plantas y les confieren resistencia contra infecciones y estrés. También ayudan a las plantas en la fijación del nitrógeno y aumentan la absorción de varios nutrientes inmóviles como el zinc y el fósforo [45].

Los NMs interactúan con los componentes del suelo (minerales y materias orgánicas) antes de internalizarse en las plantas, por lo que la biodisponibilidad de dichos componentes podría verse modificada por las propiedades fisicoquímicas del suelo, en particular el pH y la fuerza iónica del agua de los poros del suelo. Además, un gran número de microorganismos (por ejemplo, bacterias y hongos) y de fauna del suelo (por ejemplo, lombrices de tierra) se reúnen en la rizosfera centrándose en las raíces de las plantas, configurando en última instancia un entorno biótico y abiótico especial a través de los procesos de la rizosfera, por ejemplo, la secreción de las raíces, el crecimiento microbiano y la actividad de las lombrices de tierra en los suelos [48].

Estos procesos de la rizosfera podrían alterar los procesos geoquímicos de los NM, como la agregación, la antiagregación, la reacción redox y la transformación, y, en consecuencia, regular la translocación de los NM en las plantas y la respuesta fisiológica y bioquímica mediada por los NMs en los tejidos de los cultivos comestibles [48].

El hecho de que los NMs de menor tamaño tiendan a ser más tóxicos, es debido a que a medida que el tamaño disminuye, se produce un aumento considerable del área superficial por unidad de masa y del número de átomos en su superficie. [49] Esto puede aumentar en gran medida la producción de ROS, que por consiguiente puede dañar e inactivar biomoléculas esenciales, como el ADN, las proteínas y los lípidos [50].

El TiO_2 tiene una carga positiva, mientras que la superficie de los microorganismos tiene cargas negativas, lo que provoca una atracción electromagnética entre los microorganismos y las nanopartículas de TiO_2 que da lugar a reacciones de oxidación. [45] El TiO_2 inactiva las enzimas y daña al ADN al coordinarse con grupos donadores de electrones como: tioles, amidas, carbohidratos, indoles, hidroxilos, etc. La formación de orificios resultante que se forma en las paredes celulares de las bacterias provoca un aumento de la permeabilidad y la muerte celular [51].

2.6 Rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR's)

Dubey Et al. (2022) postularon que las plantas podrían modular el microbioma de la rizosfera en su propio beneficio en función de los cambios que ocurren en su comunidad mediante la estimulación selectiva de crecimiento de aquellos microorganismos beneficiosos. Las plantas son capaces de regular el mismo controlando la acumulación de rizodepositos, los cuales contribuyen a complejos procesos fisiológicos, como el crecimiento, la diferenciación celular y la supresión de microbios fitopatógenos [52].

Las plantas son capaces de reclutar bacterias beneficiosas del suelo, denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), de una amplia gama de géneros, como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pantthoeas*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*. Estas bacterias estimulan el crecimiento de las plantas, produciendo biofertilizantes,

solubilizando el fósforo, suprimiendo patógenos y actuando como inductores de tolerancia a diferentes estreses bióticos y abióticos [53].

Las PGPR son microbios asociados a las raíces de las plantas que favorecen su crecimiento proporcionándoles una mejor nutrición mineral, produciendo hormonas vegetales u otras moléculas que estimulan el crecimiento de las plantas y preparan sus defensas contra el estrés biótico y abiótico, o protegiéndolas contra los agentes patógenos al afectar a la supervivencia de los microorganismos patógenos [54].

Para considerarse una PGPR debe tener: En primer lugar, una elevada densidad poblacional en la rizosfera después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo. Después, que posean capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta. Además, que puedan controlar de manera natural y eficiente a otros microorganismos del suelo capaces de enfermar a las plantas; y, por último, que no produzcan daño en el hombre [55].

2.7 Estevia (*Stevia rebaudiana* L.)

La estevia (*Stevia rebaudiana* L.) es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Asteraceae que es nativa de Argentina, Brasil y Paraguay. Las hojas de esta planta han sido usadas por siglos en medicina y para endulzar bebidas como el *mate*. [56] La estevia, como extracto vegetal, fue adoptada comercialmente por primera vez como edulcorante en Japón en la década de los 70's, donde sigue siendo un ingrediente popular en la actualidad se cultiva principalmente en Paraguay, Kenia, China y Estados Unidos [57].

La propagación convencional de estevia muestra un porcentaje de germinación baja, menor al 10%. Esto se debe principalmente a la autoincompatibilidad que puede resultar en semillas estériles. Es por esto que, el método de propagación convencional no resulta adecuado para la producción de Estevia, optando por su reproducción mediante esquejes. [58] La estevia ha ganado un mayor interés industrial y científico en los últimos 20 años, representando una alternativa nutricional adecuada de la sacarosa y edulcorantes artificiales, llegando a ser hasta 300 veces más dulce que la sacarosa común, con un valor calórico reducido de 2.7 kcal/g [59].

Los compuestos responsables del dulzor de la *Stevia r.* son los glucósidos de esteviolo aislados e identificados como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido. Además, la estevia contiene antioxidantes, los cuales ayudan a neutralizar los radicales libres (causantes del cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes) presentes en la sangre, actuando como captadores de oxígeno y no mostrando efectos secundarios tóxicos [6].

Diversos análisis en laboratorio han demostrado que la estevia es rica en hierro, magnesio y cobalto; no contiene cafeína y posee efectos antioxidantes. Estudios señalan que el extracto de hojas de estevia actúa como bactericida sobre *Streptococcus mutans*,

responsable de las caries dentales al poseer propiedades antibacterianas y antivirales [56].

Hoy en día, se estima que anualmente, la población mundial consume alrededor de 15,000,000 toneladas de endulzantes, constituyendo así hasta un 80% de la producción mundial, 8% de otras derivadas del maíz (*Zea mays L.*) y 12% de edulcorantes químicos.

2.8 Metabolitos secundarios

Para definir los metabolitos secundarios, hay que tener en cuenta que no tienen una implicación directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas; a menudo se sintetizan a partir de metabolitos primarios; tienen una distribución que a veces se limita a un género o especie; se acumulan en altas concentraciones [1-3% peso fresco]; pueden mostrar una elevada toxicidad; pueden tener un marcado efecto biológico sobre otros organismos; con frecuencia tienen diferentes lugares de producción y acumulación en las vacuolas en forma glicosídica o se acumulan en estructuras secretoras especiales, por ejemplo, tricomas, conductos, canales, laticíferos [60].

Los metabolitos secundarios son sustancias sintetizadas por las plantas que las hacen competitivas en su propio entorno. Estas pequeñas moléculas ejercen una amplia gama de efectos sobre la propia planta y sobre otros organismos vivos. Inducen la floración, la fructificación y la pérdida de un órgano de la planta (hoja, flor o fruto), mantienen el crecimiento perenne o señalan el comportamiento caducifolio. De igual forma actúan como antimicrobianos y desempeñan el papel de atrayentes o, a la inversa, como repelentes. A la fecha, se han descubierto más de 50.000 metabolitos secundarios en el reino vegetal [61].

Los productos provenientes del metabolismo primario (aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etc.) participan en el crecimiento y supervivencia de las plantas, pero los metabolitos secundarios (como fenoles, actividad antioxidante, terpenos, alcaloides, etc.) actúan como mediadores, interviniendo en las funciones de la planta o de los organismos con los que interacciona, participando en las respuestas a innumerables variables. Dando como resultado que la variación de las condiciones ambientales (incidencia de luz, precipitación y nutrientes) las interacciones bióticas (herbívora, ataque por microorganismos, competencia por el espacio en suelo, los nutrientes o la luz) puedan influir en la síntesis de metabolitos secundarios [62].

2.9 Actividad Antioxidante

Los radicales libres que se encuentran en las plantas tienen un papel muy importante en el daño a los tejidos, siendo por esto que los antioxidantes actúan como sustancias que (en cantidades pequeñas) son capaces de poder prevenir, retardar o incluso parar la oxidación de materiales oxidables como lo son las grasas, las proteínas, el ADN y los carbohidratos [63].

El antioxidante es una sustancia que exhibe la habilidad de transferir electrones y/o átomos de hidrógeno durante una neutralización de radicales libres. [64] La capacidad antioxidante de compuestos fenólicos es dependiente del número de grupos hidroxilo, los cuales confieren gran estabilidad en la estructura de anillo y sus arreglos. Una posición *orto* confiere gran estabilidad al radical formado después del proceso de neutralización [65].

Las condiciones desfavorables para las plantas, como la temperatura extrema, la sequía, los metales pesados, las deficiencias de nutrientes y la alta salinidad, generan altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden causar estrés oxidativo. Para evitarlo, las células disponen de un complejo sistema antioxidante con elementos enzimáticos y no enzimáticos. Las moléculas del sistema no enzimático tienen diferentes mecanismos de acción, como la inhibición enzimática, la quelación de oligoelementos implicados en la producción de radicales libres, la captación y activación de especies reactivas o el aumento de la protección a través de otras defensas antioxidantes [66].

2.10 Carotenoides

Los carotenoides, junto con los flavonoides y las clorofilas, son los pigmentos vegetales más distribuidos en la naturaleza. Juegan un importante papel como antioxidantes y factores provitamínicos en muchos organismos, que deben incluirlos en su dieta debido a que sólo los organismos fotosintéticos, y ciertas bacterias y hongos, son capaces de sintetizarlos. [67] Los carotenoides siempre acompañan a la clorofila en una relación de tres a cuatro partes de clorofila por una parte de carotenoide. Estos pigmentos se encuentran en frutas y vegetales amarillos y en los cloroplastos de tejidos verdes, donde están enmascarados por la clorofila hasta que el tejido envejece [68].

La actividad antioxidante de estos pigmentos depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración *cis* o *trans*, etc.), su concentración, la presión parcial de oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E [69].

3 Justificación y descripción del problema

La era de la agricultura de precisión (AP) no se concibe sin el uso de los NMs, por ejemplo, la adición de nanopesticidas para el manejo de plagas, nanofertilizantes para el aumento en los rendimientos agrícolas, nanoarcillas para la recuperación de la calidad de los suelos y la transferencia de genes para el desarrollo de variedades resistentes a plagas y a ambientes extremos, además, el uso de nanosensores basados en “sistemas de entrega inteligentes” puede contribuir al uso eficiente de recursos como el agua, los nutrientes y otros agroquímicos [23].

Dentro de estos NMs, se encuentra el TiO₂, del cual se han estudiado sus efectos en plantas y bacterias, su efecto antibacteriano se debe a sus propiedades fotocatalíticas

por las que el TiO_2 genera especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan las paredes celulares microbianas. Incluso en ausencia de luz, se sabe que el TiO_2 inhibe el crecimiento bacteriano [4].

La producción mundial de la estevia es entre las 100 mil y 200 mil toneladas, representa un mercado mundial de 400 millones de dólares en ventas y hoy constituye el segundo edulcorante de mayor consumo a nivel global. [23] Es una planta susceptible al ataque de plagas y enfermedades, sus problemas fitopatológicos mayores son los ocasionados por hongos y nematodos, mientras que las plagas más frecuentes son los ácaros e insectos masticadores, raspadores y succionadores.

Se sabe que en la rizosfera la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa, en este caso se puede considerar la rizosfera como una zona de amortiguación microbiológica en donde la microbiota sirve de protección a la planta frente al ataque de patógenos. Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales inciden sobre este componente afectando tanto a su biodiversidad como a la densidad de las poblaciones microbianas implicadas; los resultados a mediano y largo plazo pueden ser la pérdida de fertilidad de los suelos y su progresiva depauperación [24].

Los factores mencionados inciden negativamente en el rendimiento y calidad del producto, debiendo realizarse un estricto control de estos. [22] Así mismo, no existen investigaciones sobre la interacción de TiO_2 con la rizosfera de esta planta, por lo que es de interés realizar un estudio en este campo para conocer los efectos en el desarrollo de la planta a partir de la relación TiO_2 -suelo.

4 Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

La interacción de las nanopartículas de TiO_2 con plantas de estevia (*Stevia rebaudiana L.*) genera cambios en la rizosfera de la planta y por ende un efecto en el desarrollo de la planta.

4.2 Objetivo General

Evaluar los cambios en la rizosfera y en el crecimiento de la planta de estevia (*Stevia rebaudiana L.*) a partir de la interacción con el TiO_2 .

4.3 Objetivos específicos

- Obtener nanopartículas de TiO_2 mediante la síntesis por Sol-Gel.
- Caracterizar los NMs de TiO_2 para obtener tamaño y morfología, por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos X (XRD) y Espectroscopía Raman.

- Evaluar cambios en la cantidad de unidades formadoras de colonias de las bacterias *Pseudomonas mediterránea* (749) y *Pantoea antophila* (751) *in vitro* por efecto del TiO₂.
- Evaluar cambios en la composición y producción de glucósidos posterior a la interacción de la estevia con TiO₂.

5 Metodología

5.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de TiO₂

La síntesis para la obtención de nanopartículas de TiO₂ se llevó a cabo colocando en un vaso de precipitado 40.8 ml de isopropanol con agitación constante en una plancha con atmósfera de nitrógeno a 40 psi durante 20 minutos. Después, se vertieron 4.2 ml de TTiP (isopropóxido de Titanio) y se dejó en agitación durante 20 minutos. Posteriormente, se agregaron 40.5 ml de agua destilada mediante un goteo lento a flujo constante por las paredes y se dejó en agitación por 60 minutos, una vez terminado, se filtró y secó a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se molió el polvo de TiO₂ y se colocó en un crisol para posteriormente calcinarlo en la mufla a 450°C por 3 horas.

La morfología de las muestras de TiO₂ fue analizada usando las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando el microscopio JEOL JSM-6060 LV, con un voltaje de aceleración de 15 Kv y de igual forma, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando el microscopio JEOM JEM 200FX.

De igual forma, el análisis cristalino de la muestra se realizó mediante la técnica de difracción de rayos X (XRD), se llevó a cabo con el equipo Bruker D8 equipado con un tubo de cobre sellado para generar radiación Cu K α ($\lambda=1,5406$ A) con ángulos de $10 < 2\theta < 80^\circ$ en paso de 0.01° . Mientras que 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 8, con un láser de NdYGa ($\lambda=532$ nm).

5.2 Pruebas *in vitro*

El proceso de las pruebas *in vitro* se muestra en la Figura 5., Primero se colocó 1 g de Peat Moss en 28 tubos cónicos de 50 ml, los cuales se esterilizaron en autoclave y se distribuyeron de la siguiente manera:

- Grupo A: 3 tubos de control con suelo estéril.
- Grupo B: 3 tubos de suelo + *Pseudomonas mediterránea*.
- Grupo C: 3 tubos de suelo + *Pantoea antophila*.
- Grupo D: 3 tubos de suelo + *Pseudomonas mediterránea* + 10 ppm TiO₂.
- Grupo E: 3 tubos de suelo + *Pseudomonas mediterránea* + 5 ppm TiO₂.
- Grupo F: 3 tubos de suelo + *Pantoea antophila* + 10 ppm TiO₂.
- Grupo G: 3 tubos de suelo + *Pantoea antophila* + 5 ppm TiO₂.

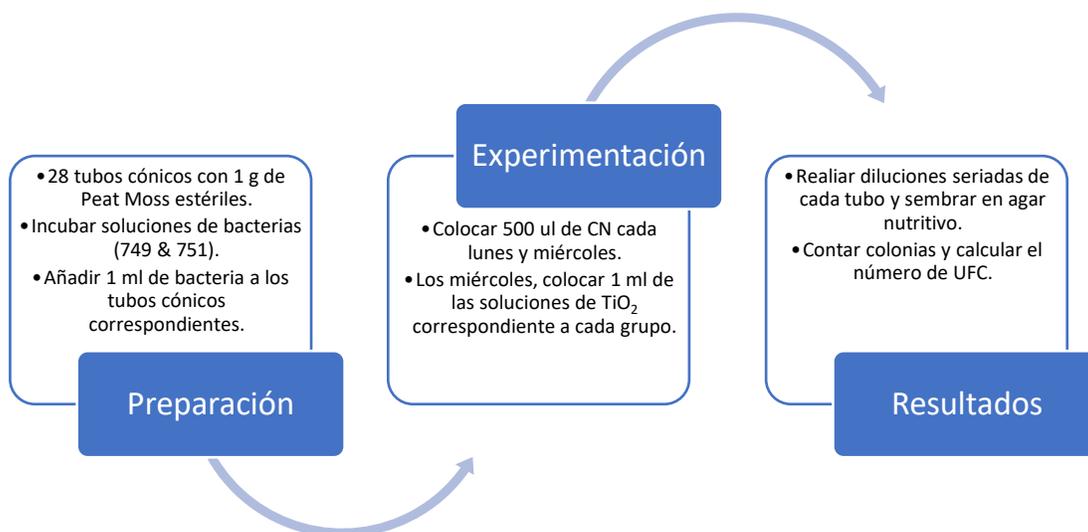


Figura 5. Proceso de experimentación para minimacetos.

Una vez marcados los tubos, se prepararon 3 matraces con 40 ml de caldo nutritivo (CN), posteriormente se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos a una presión de 20 psi.

Se inocularon las bacterias en los matraces con CN, para esto, se colectó una colonia de cada bacteria (749 & 751) utilizando un palillo de madera y una pinza previamente esterilizados, después se colocaron los palillos con bacteria dentro de los matraces para finalmente dejar incubando a 27°C durante 48 horas.

Después de 48 horas, se utilizó una micropipeta para extraer 1000 μ l de cada solución líquida de bacterias. También se tomó una muestra de 1000 μ l del matraz de control de CN que no había sido inoculado. Cada alícuota se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y se colocó en una celda para medir la densidad óptica de las bacterias utilizando un espectrofotómetro Multiskan Go. Las concentraciones de bacterias se ajustaron a la densidad óptica de 1.0 a 600 nm. De esta manera, se inoculó 1 ml de cada tipo de bacteria en el correspondiente tubo cónico.

A partir de esto, durante 30 días, los lunes y miércoles, se añadieron 500 μ l de CN en los tubos cónicos que contenían bacterias. Adicionalmente, los miércoles, se incorporaron 1000 μ l de 5 y 10 ppm TiO_2 en sus grupos correspondientes.

Al terminar este periodo, se prepararon 500 ml de agar nutritivo, el cual se esterilizó durante 25 minutos a 20 psi y una vez terminado, el agar se vertió en cajas Petri.

Finalmente, se realizaron diluciones seriadas, hasta 1:10000 con 900 μ l de solución fisiológica y 100 μ l de cada tubo. Para cada dilución se mezclaron los tubos con ayuda

del vortex antes de volver a diluir. Una vez terminadas las diluciones, se vertieron 100 μl de la dilución en la caja Petri, y se mezclaron con perlas de vidrio estériles, se distribuyó el inóculo, una vez secas las cajas incubaron durante 24 horas a 28°C.

Pasadas las 24 horas de incubación, se realizó un conteo de colonias en las cajas Petri, se realizó el cálculo de UFC (unidades formadoras de colonias) de cada una de las placas y finalmente, se hizo un análisis de éstos con base a los resultados de los controles.

5.3 Exposición a luz UV

Una vez sembradas y contadas las diluciones, se expusieron los microtubos correspondientes a las diluciones sembradas a luz ultravioleta con ayuda de una caja UV, como se muestra en la Figura 6, durante los siguientes tiempos: 7 minutos y 8 minutos. Al acabar cada periodo de tiempo, se procedió a sembrar de nuevo las diluciones correspondientes con el objetivo de observar si hubo cambios en el número de UFC.

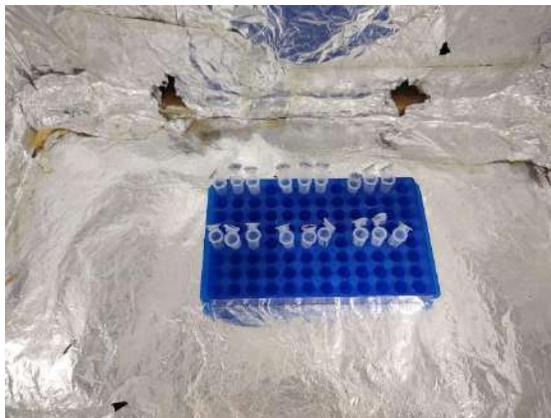


Figura 6. Diluciones expuestas a luz UV.

5.3.1 Pruebas *In vivo*

Para las pruebas *in vivo*, se cuidaron 9 plantas de estevia, (The Home Depot store). Las plantas fueron trasplantadas a un invernadero ubicado en el Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro. Este invernadero mantuvo una temperatura interna constante de 34.6 °C y una humedad relativa del 82%. Además, se eligió una ubicación estratégica que garantizara una exposición prolongada a la luz solar durante la mayor parte del día, como se ilustra en las Figuras 7 y 8, donde se aprecia una planta de estevia. Durante el desarrollo del experimento, se llevó a cabo la medición de las plántulas de estevia, y se realizaron extractos de sus hojas con el propósito de llevar a cabo análisis sobre su capacidad antioxidante y el contenido de clorofila. Estos



Figura 7. Invernadero.

análisis se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Las macetas de estevia se dividieron en 3 grupos, de la siguiente manera:

- Grupo A: tratamiento con agua.
- Grupo B: tratamiento con TiO_2 concentración A (10 ppm)
- Grupo C: tratamiento con TiO_2 concentración B (5 ppm)

Durante un lapso de 4 semanas, se aplicaron a los cultivos dos soluciones de TiO_2 . La primera solución tenía una concentración de 5 ppm, mientras que la segunda solución tenía una concentración de 10 ppm. En ambos casos, se administraron 50 ml por planta.

Al finalizar este periodo, se obtuvieron los extractos de los diferentes grupos, y se realizaron nuevamente los estudios de capacidad antioxidante y clorofila para posteriormente comparar los resultados del control.



Figura 8. Maceta de Estevia.

Aunado a esto, se consiguieron 8 plantas de estevia, teniendo los siguientes grupos:

- Grupo A: 2 plantas tratadas con agua.
- Grupo B: 3 plantas tratadas con TiO_2 a 5 ppm.
- Grupo C: 3 plantas tratadas con TiO_2 a 10 ppm.

A las cuales se les retiró de su maceta para mezclar el suelo y posteriormente se tomó una muestra en matraces estériles para ser tratadas durante el periodo de un mes. Teniendo una dosis de 1000 μl para su grupo correspondiente. Finalizado este periodo, se realizaron diluciones y finalmente se sembraron en cajas Petri para su conteo de colonias y el cálculo de UFC.

5.3.2 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH (2-2-difenil-1-1-picrihidrazil)

La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó mediante la cinética de reacción para verificar el tiempo en el que se neutraliza la actividad contra el DPPH. Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de una estequiometría con respecto al número de H^* absorbidos, de manera que se oxida de una coloración violeta a una amarilla, como se muestra en la Figura 9. , La cinética se midió en el multiskan go a una longitud de onda de 520 nm con diferentes periodos de tiempo: 0,4,10,30,60,90 y 120 minutos, posteriormente, se graficaron las concentraciones de trolox (X) con respecto al % inhibición (Y) para verificar la actividad de DPPH.

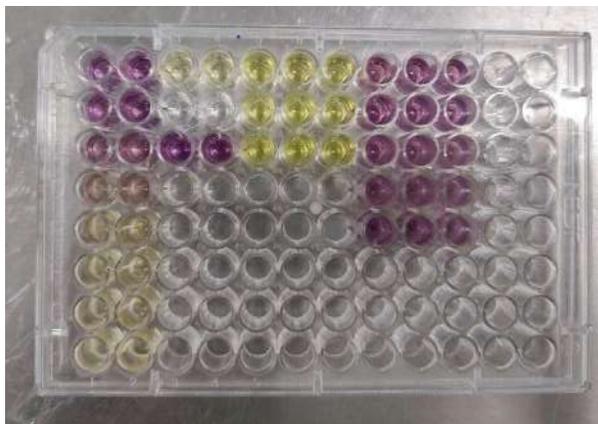


Figura 9. Oxidación del radical DPPH.

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 minutos cubriendo totalmente de la luz.

Solución stock de trolox

Se pesaron 0.0025 g de trolox para aforar con metanol a 10 mL, teniendo así una solución Stock de trolox con una concentración de 1 mM como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. 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 por triplicado 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 seleccionó el tiempo en la que la muestra puede ser leída, típicamente se toman los valores obtenidos en un tiempo de 60 o 90 minutos, siendo el tiempo de 60 minutos el ideal debido a que, en ese tiempo, es cuando el radical ya es estable. De manera que se calculó el porcentaje (%) de inhibición del radical con la siguiente ecuación:

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

5.3.3 Determinación de capacidad antioxidante por ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-acido sulfónico)

El llamado ensayo ABTS es uno relativamente reciente, que implica un radical más drástico, producido químicamente, y se utiliza a menudo para el cribado de mezclas complejas de AH, como extractos de plantas, bebidas y fluidos biológicos. Por esta razón, el protocolo para la producción del radical se modificó gradualmente para garantizar que el AH reaccionara únicamente con el radical y no con otros reactivos. Actualmente, el radical se produce químicamente mediante la oxidación con $K_2S_2O_8$.

Solución ABTS:

Se pesaron 0.01920 g de ABTS y se aforó a 5 ml con agua destilada, de igual forma se pesaron 0.1892 g de persulfato de potasio y se aforó a 5 ml con agua destilada. Seguido de esto, se colocaron 88 μ l de la solución del persulfato de potasio en la solución de ABTS y se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas en completa oscuridad. Al pasar este tiempo, se midió la absorbancia de la solución a 734 nm hasta alcanzar una absorbancia de entre 0.68-0.72 diluyendo con etanol si es necesario.

Solución stock de trolox

Se pesaron 0.0025 g de trolox para aforar con metanol a 10 mL, teniendo así una solución Stock de trolox con una concentración de 1 mM. Los volúmenes para la curva de calibración es la misma que para el proceso mediante DPPH, mostrándose en la Tabla 1.

En este caso, a diferencia del radical DPPH, se toma el resultado de la medición instantánea, debido a que esta es una reacción rápida. Una vez realizada la medición, se calculó el porcentaje (%) de inhibición del radical mediante la ecuación (1).

5.3.4 Determinación de clorofila

La cuantificación de clorofila llevó a cabo como se muestra en la Figura 10. , Recolectando hojas de las plantas de estevia y posteriormente se pesaron 0.5 g de muestra para macerarlo en un mortero adicionando 12.5 ml de solución de acetona al 80%, hasta conseguir el extracto, posteriormente se colocaron las muestras en tubos para centrifuga y se centrifugaron a 4500 rpm por 5 minutos a 4° C. Finalmente se midieron los extractos en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 645 y 663 nm utilizando una muestra de acetona al 80% como blanco.

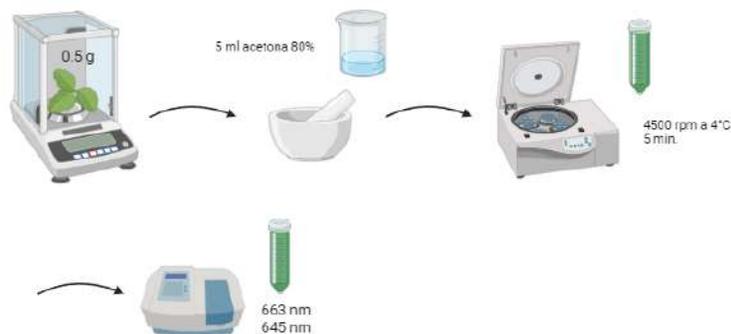


Figura 10. Determinación de clorofila

6 Resultados

6.1 Caracterización del dióxido de titanio (TiO₂) obtenido por sol-gel

6.1.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 12. , Muestra la morfología de la superficie observada mediante la técnica SEM a una magnificación de 4000x para las nanopartículas de TiO₂ sintetizadas por el método sol-gel. Donde se pueden observar partículas con una morfología que va esférica a amorfa, las cuales ayudan a mejorar la biocompatibilidad al entrar en contacto con sistemas biológicos, de igual forma se observa que estas se encuentran aglomeradas, lo cual puede influir en una posible acumulación y aumento de toxicidad en sistemas biológicos. [70-72]

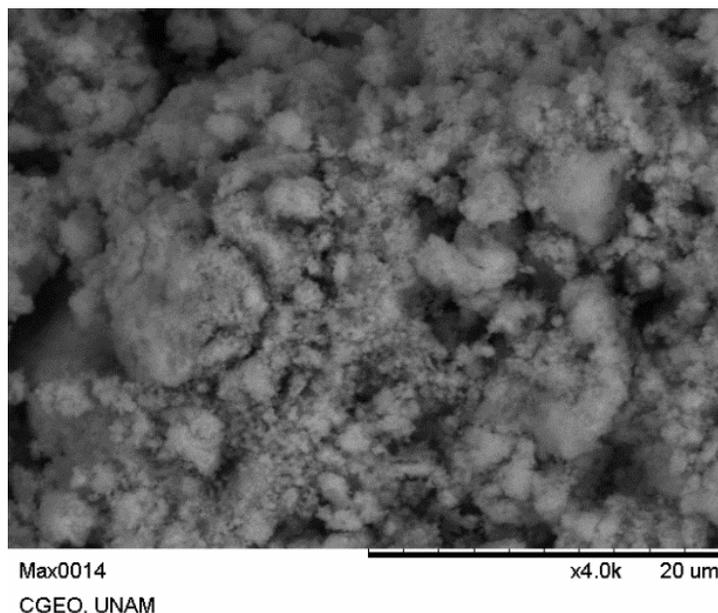


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO₂ sintetizadas por el método sol-gel.

6.1.2 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

En la Figura 13. , Se observa que, a un aumento de 200 nm, las nanopartículas de TiO₂ sintetizadas por el método de sol-gel se encuentran partículas aglomeradas además de tener una morfología mayormente esférica y un tamaño homogéneo con los bordes bien definidos. Las diferentes tonalidades de gris indican la diferencia en densidades y espesores de la muestra.

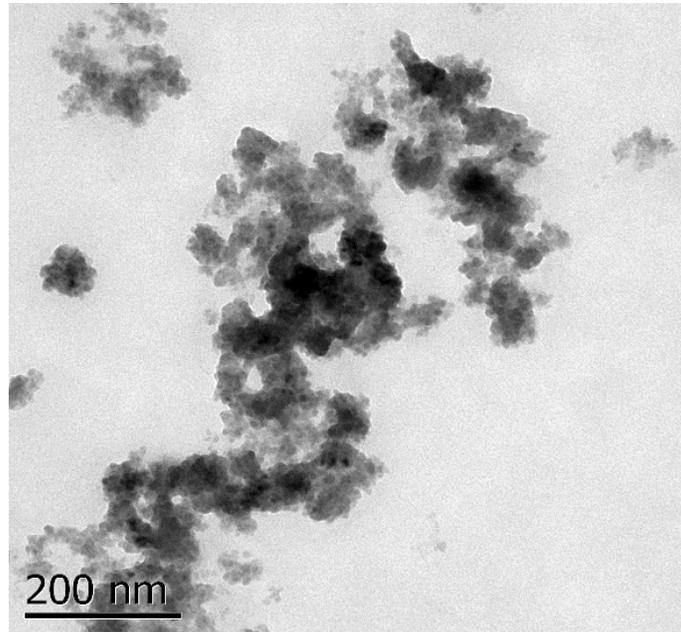


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por el método Sol-Gel.

6.2 Difracción de rayos X (XRD)

En la Figura 14. , Se muestran los patrones de difracción de rayos X de las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por sol-gel, donde se pueden apreciar las señales en los ángulos 2θ ($25.4^\circ, 38.01^\circ, 40.20^\circ, 54.18^\circ, 55.12^\circ, 62.74^\circ, 68.98^\circ, 70.48^\circ, 75.36^\circ$), siendo estas 9 señales de difracción indicativas de la presencia de la fase cristalina anatasa del TiO_2 . Patrón el cual coincide con la ficha JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) n°21-1272 y con diversa bibliografía [73]. De igual forma, se observa que la intensidad de la señal en 25.4° y 54.18° indican que el TiO_2 se encuentra en la fase anatasa, por último, la intensidad de las señales del XRD refleja que las nanopartículas formadas son cristalinas y de igual forma, el ancho de las señales sugiere un tamaño de nanopartícula pequeño. El tamaño de cristalito fue calculado por medio de las ecuaciones de Scherrer y la ecuación de Williamson-Hall, obteniendo un valor de 8.7 nm con la ecuación de Scherrer (Ecuación 2):

$$D = \frac{k\lambda}{d\cos\theta} \quad (2)$$

y 10.2 nm por medio de la ecuación de Williamson-Hall (Ecuación 3):

$$\beta_{Total}\cos\theta = \varepsilon(4\sin\theta) + \frac{K\lambda}{D} \quad (3)$$

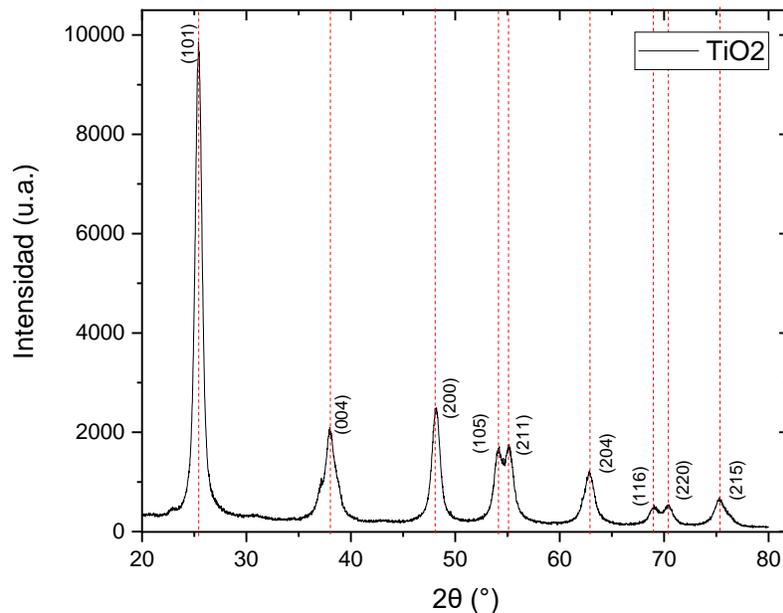


Figura 13. Patrón de difracción de rayos X se nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por sol-gel.

6.3 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman nos ayuda a identificar los modos vibracionales de los materiales y normalmente se utiliza como una técnica complementaria a la difracción de Rayos X para el reconocimiento de fases cristalinas. En la Figura 15., Se muestra el espectro Raman de las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por sol-gel, identificando así señales en $143.75, 198.11, 397.60, 514.57$ y 638.46 cm^{-1} los cuales son indicativos de la presencia de la fase cristalina anatasa y donde a su vez, se muestran señales alrededor de 545 cm^{-1} y 640.5 cm^{-1} que sugieren la presencia de la fase brookita del TiO_2 , lo cual podría deberse a la temperatura y el tiempo al que se calcinó la muestra.[74]

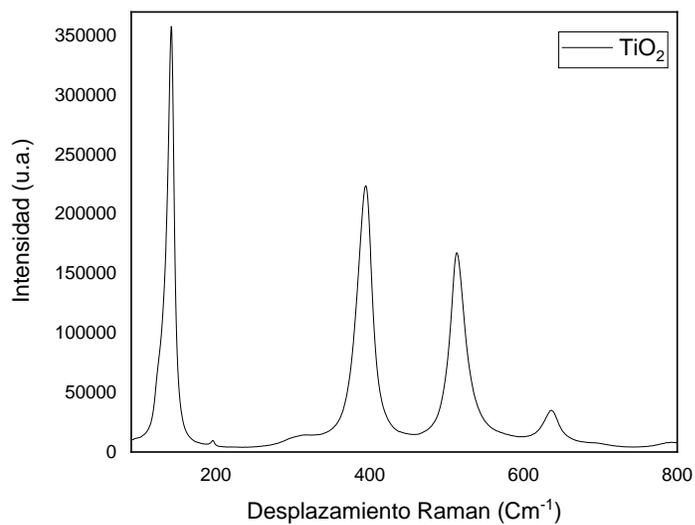


Figura 14. Espectro Raman de las nanopartículas de TiO₂ sintetizadas por el método sol-gel.

6.4 Pruebas *in vitro*

6.4.1 Suelo recuperado de plantas de Estevia

Por medio de este experimento, se pudo determinar si el suelo recuperado que fue tratado con TiO_2 tuvo algún cambio en cuanto a la presencia de bacterias en comparación con el suelo que solamente fue tratado con agua. En la Tabla 2., se muestra el número de UFC correspondientes a cada muestra antes y después del tratamiento. Mientras que en la Figura 25., Se muestran las placas Petri sembradas antes y después de la experimentación, donde en la Figura 16. a) y c), se puede observar la placa B_3 , siendo la imagen de la izquierda antes del tratamiento, teniendo un número de UFC de 1.39×10^7 , mientras que la imagen de la derecha muestra la placa B_3 después del tratamiento con un número de UFC de 3.20×10^5 . En la Figura 16. b) y d), Se muestra la placa C_2 mostrando un número de UFC de 3.36×10^8 antes del tratamiento, y un número de UFC de 8.80×10^5 después del tratamiento.

Tabla 2. Número de UFC antes del tratamiento del suelo de cada planta.

Grupo	UFC PRE-tratamiento	UFC post-tratamiento
A	$8.31\text{E}+08 \pm 1.16\text{E}+09$	$5.2\text{E}+05 \pm 1.41\text{E}+05$
B	$9.24\text{E}+06 \pm 7.47\text{E}+05$	$2.21\text{E}+05 \pm 8.62\text{E}+04$
C	$4.56\text{E}+08 \pm 4.85\text{E}+08$	$6.33\text{E}+05 \pm 2.16\text{E}+05$

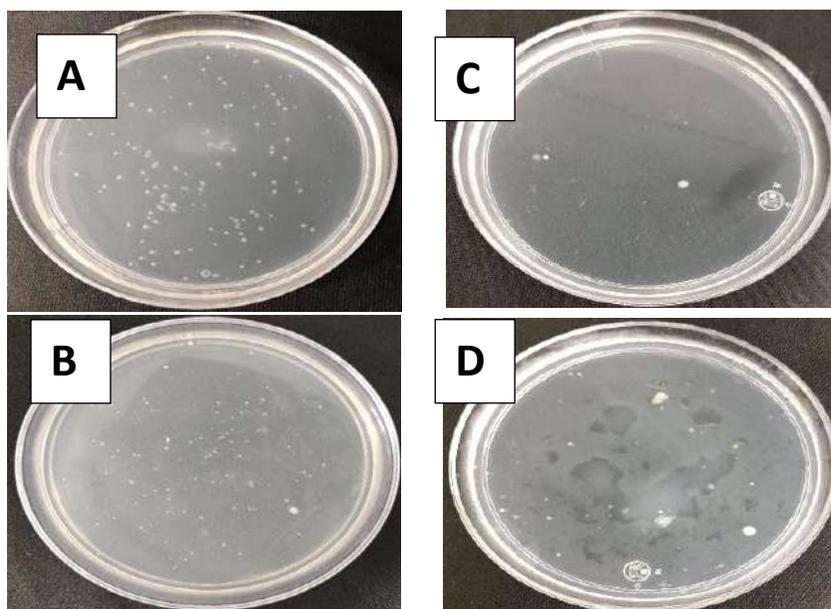


Figura 15. Sembrado de diluciones, a),c) Placas grupo B, b),d) Placas grupo C.

De manera que se puede observar que en los grupos B y C hubo una disminución en el número de UFC tras la aplicación del TiO₂. Sin embargo, también podemos observar que disminuyó el número de UFC en el control, lo cual podría ser debido a un parámetro utilizado en microbiología, siendo este la *actividad del agua* (*Aw*). El cual especifica que cuanto menor es la actividad del agua de un alimento, mayor es su vida útil, dado que significa que contiene menor cantidad de agua disponible para que los microorganismos puedan desarrollarse.

La *Aw* establece el rango de inicio y final del crecimiento de muchos microorganismos; en este caso, al recuperar suelo húmedo de las macetas, no se sabía que tipos de bacterias estaban presentes, por lo que la *Aw* pudo haber sido diferente para la cantidad de bacterias que se encontraban en el suelo, siendo este un motivo externo por el cual también pudo haber disminuido el número de UFC. [75]

6.4.2 Minimacetas

Los datos obtenidos para este experimento se muestran en la Tabla 3. , Donde se especifican los valores de las UFC para los distintos grupos de este experimento, siendo estos:

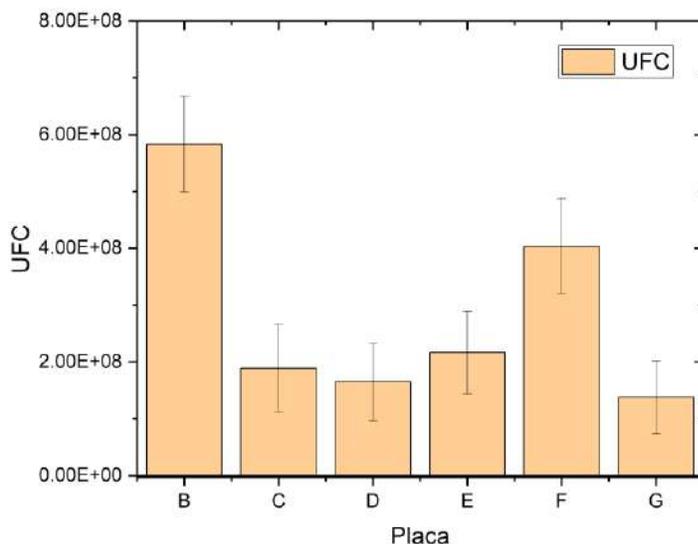


Tabla 3. Número de UFC de las placas, siendo los grupos; a) control, b) control *Panthoea Antophila*, c) control *Pseudomonas Mediterránea*, d) *Panthoea* + TiO₂ 5 ppm, e) *Panthoea* + TiO₂ 10 ppm, f) *Pseudomonas* + TiO₂ ppm, g) *Pseudomonas* + TiO₂ 10 ppm.

Se puede observar que no hubo un efecto significativo al aplicar el TiO₂ a diferentes concentraciones, esto puede deberse al hecho de colocar nutrientes en forma de caldo nutritivo y también al hecho de que ambas bacterias, son de carácter gran negativas, de

manera que poseen una bicapa lipídica, lo que puede llegar a hacer más complicado que el material pueda penetrar las membranas para disrumpir la pared celular y finalmente provocar así la muerte celular, de manera que estos factores pudieron contribuir a un efecto de adaptación de las bacterias con respecto al TiO_2 . [76] En la Figura 17. , Se muestran las placas de los tratamientos de cada bacteria, siendo la Figura 17 a) correspondiente al sembrado de las diluciones perteneciente al grupo de *Panthoea Anthophila*: dilución de control (B_3), b) dilución después del tratamiento con 5 ppm TiO_2 (D_3) c) dilución después del tratamiento con 10 ppm TiO_2 (E_3). Mientras que la figura 17 d), e) y f). , Muestran las diluciones de control C_2 , dilución después del tratamiento con 5 ppm TiO_2 (F_2) y dilución después del tratamiento con 10 ppm TiO_2 (G_2) respectivamente.

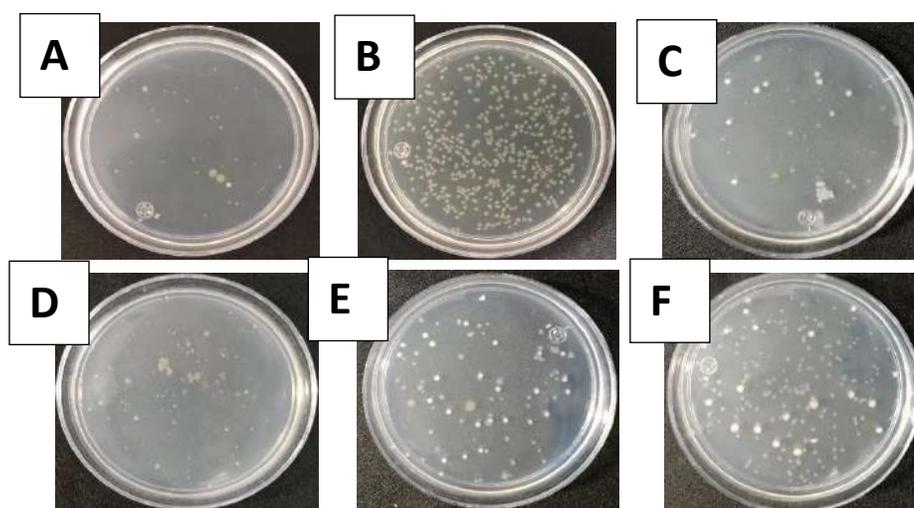


Figura 16. Sembrado de diluciones de control, *panthoea antophila* y *pseudomonas mediterránea*.

6.4.3 Exposición de minimacetos a luz UV

Para la segunda parte del experimento de las minimacetos, se tomaron las diluciones correspondientes de cada grupo para posteriormente exponerlas a luz UV durante 7 y 15 minutos con el objetivo de observar si había algún cambio en el número de UFC debido a la exposición del TiO_2 y las bacterias a la luz UV. Estos tiempos fueron escogidos por 2 motivos: (i) garantizar la fotocatalisis del TiO_2 debido a su activación mediante la luz UV, (ii) además de que en la industria alimenticia típicamente se utilizan estos tiempos para la inocuidad de alimentos. [11] [77]

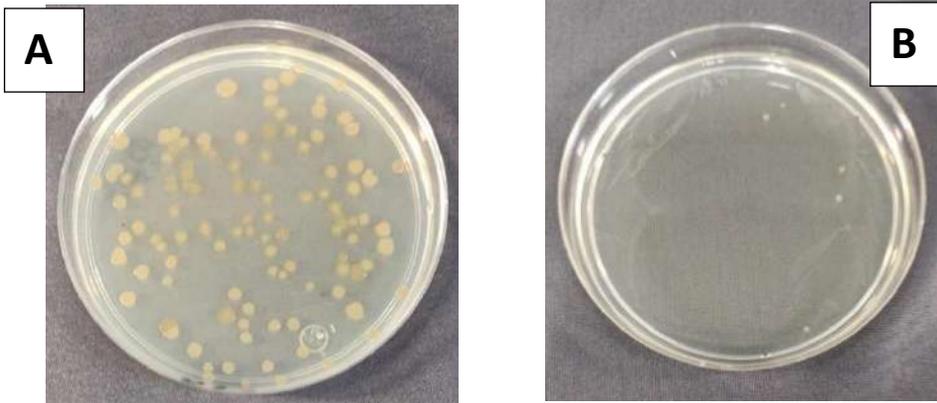


Figura 17. Sembrado de dilución D3 antes y después de exposición a luz UV durante 7 minutos.

En la Figura 17, Podemos observar el cambio en el número de UFC en la dilución D₃, siendo a) antes de la exposición y b) posterior a la exposición durante 7 minutos.

En la Tabla 4. , Se muestra el número de UFC pasado los 7 minutos de exposición, en donde se puede observar que disminuyó la cantidad de colonias y, por ende, de UFC en las diluciones.

Tabla 4. Número de UFC en 7 minutos sobre la exposición con luz UV.

Grupo	UFC
B	$4.70E^6 \pm 8.05E^6$
C	$3.33E^6 \pm 5.77E^6$
D	$1.70E^6 \pm 2.86E^6$
E	$3.33E^6 \pm 5.77E^6$
F	0
G	0

En la Figura 19 a). , Se muestra la dilución C₂ antes de su exposición, mientras que en la Figura 19 b). , se observa después a la exposición, teniendo así una disminución total en el número de colonias y UFC posterior a 15 minutos de exposición a luz UV.

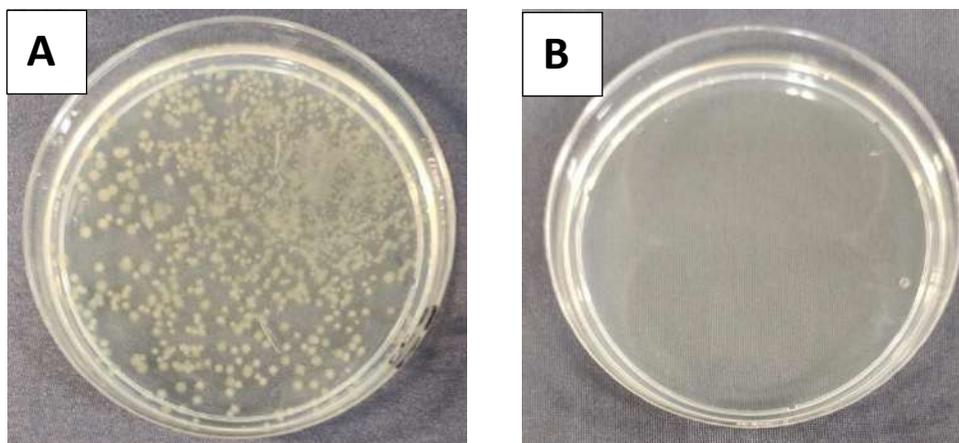


Figura 18. Sembrado de dilución C2 antes y después de exposición con luz UV durante 15 minutos.

Finalmente, podemos observar que en la Tabla 5., Pasados los 15 minutos de exposición hubo una disminución total en el número de colonias y UFC de las diluciones. Esto se explica debido a que el TiO_2 es fotoactivo si está en contacto con la luz UV, liberando así iones, causando así una disrupción en la membrana celular, causando la muerte celular de las bacterias.

Tabla 5. Número de UFC pasados 15 minutos de exposición a luz UV.

Placa	UFC
B	$3.33\text{E}^6 \pm 5.77\text{E}^6$
C	0
D	$1.33\text{E}^7 \pm 2.31\text{E}^7$
E	0
F	0
G	0

6.5 Pruebas *in vivo*

6.5.1 Altura de las plantas

Por medio de la medición de la altura de cada planta de cada grupo durante 3 semanas, es que se pudo hacer una determinación de si su tratamiento con TiO_2 afectó alguna propiedad morfológica de estas, teniendo los siguientes grupos:

- 3 plantas de control, tratadas con agua.
- 3 plantas tratadas con TiO_2 a 5 ppm.
- 3 plantas tratadas con TiO_2 a 10 ppm.

En la Figura 20., Se muestra que, al medir las distintas alturas de las plantas de cada grupo, las plantas tratadas con TiO_2 a 10 ppm tuvieron un mayor porcentaje de crecimiento en



promedio (97.49%) en comparación con el grupo tratado con TiO_2 a 5 ppm (87.75%) y las plantas de control (42.64%). En la Figura 21., se muestran las plantas de estevia en su última semana de tratamiento.

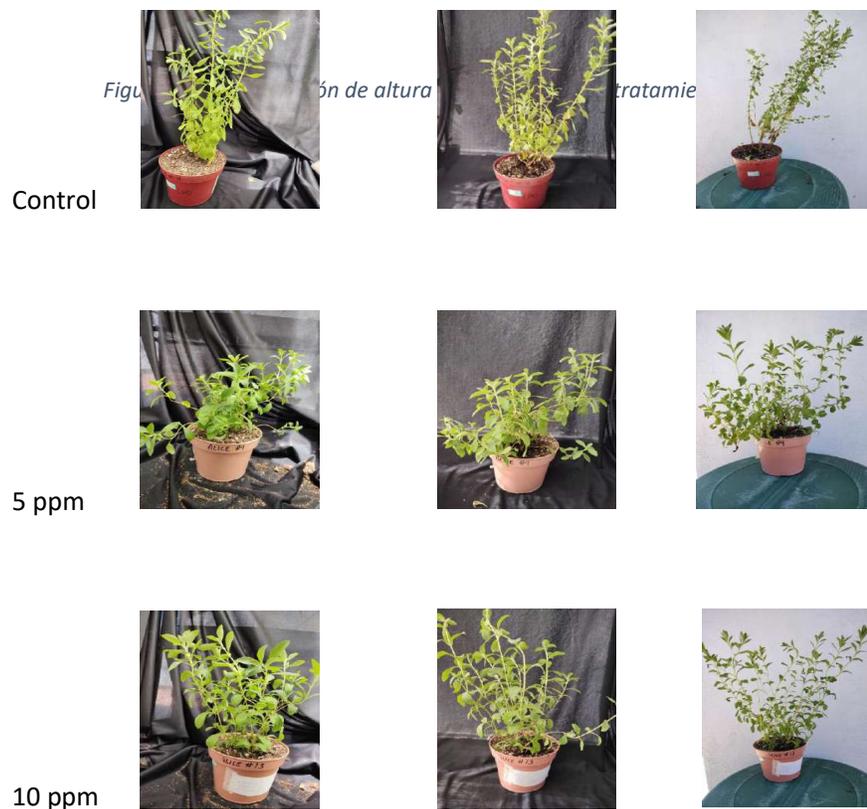


Figura 20. Plantas de estevia en su última semana de tratamiento.

6.5.2 Capacidad antioxidante

Para las pruebas de capacidad antioxidante por medio de DPPH, en la Figura 22 a)., Se observa una disminución en la capacidad de inhibición del radical comparando la primera semana con la tercera en los grupos tratados con TiO_2 , se reportó una disminución del 66% para el grupo tratado con 5 ppm y una disminución del 31% para el grupo tratado con 10 ppm. Sin embargo, al observar los resultados de la sexta semana, podemos notar un aumento considerable en la capacidad de inhibición del DPPH, indicando así que después de pasar un periodo de adaptación y de estrés causado por el TiO_2 los nutrientes se potencian.

Por otro lado, en la Figura 22 b). , se observa que, para el grupo tratado con 5 ppm de TiO_2 hubo una disminución del 30% en la capacidad de inhibir el radical ABTS, mientras que en la sexta semana de tratamiento hubo un ligero aumento del 3% en la capacidad de inhibición del ABTS.

En el tratamiento con 10 ppm de TiO_2 , se observa que en la tercera semana hubo una disminución del 33% de la capacidad de inhibición, mientras que en el tratamiento con 10 ppm de TiO_2 tuvo lugar un aumento del 10% en la capacidad de inhibir el ABTS.

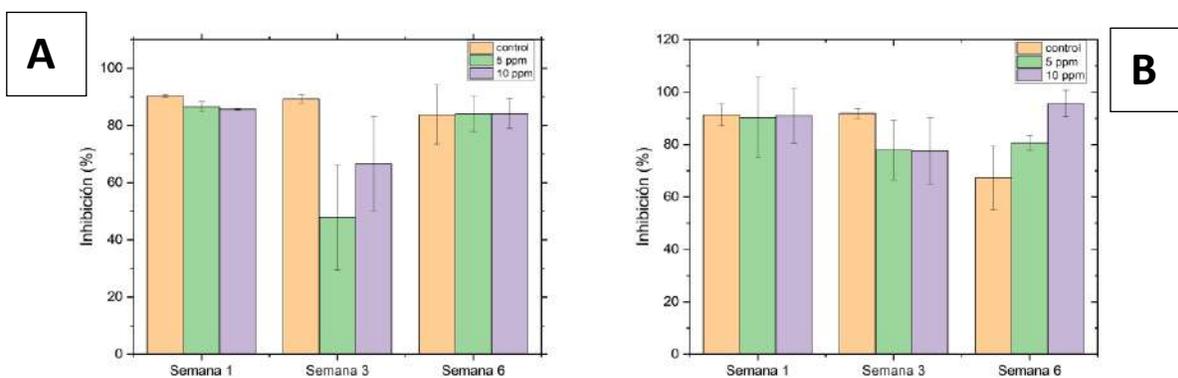


Figura 21. Capacidad Antioxidante: a) DPPH, b) ABTS.

El fenómeno observado en ambos experimentos se atribuye al estrés que experimentan las plantas debido al contacto con el dióxido de titanio. Esta situación puede causar una disminución en su rendimiento en la tercera semana, lo cual podría ser un proceso de adaptación de la planta para enfrentar el estrés inducido por el titanio. Posteriormente, en la sexta semana, se aprecia un aumento en los nutrientes, lo que sugiere una recuperación y adaptación exitosa de la planta al estrés inicial. [78]

Se puede notar que, al aumentar la concentración de dióxido de titanio, la planta muestra una mejor recuperación, lo que indica una respuesta positiva a mayores niveles de exposición al compuesto. Además, se destaca un significativo aumento en la capacidad antioxidante de las plantas desde la tercera hasta la sexta semana, lo cual puede estar relacionado directamente con la presencia de carotenoides y otros compuestos antioxidantes que se generan en respuesta al estrés provocado por el dióxido de titanio.

6.5.3 Determinación de Clorofila y Carotenoides

En clorofila, en la Figura 23., se observa que con el tratamiento con 5 ppm de TiO_2 hubo una disminución del -5% en comparación a la primera semana, mientras que en la sexta semana se observa una disminución del -16% en la concentración de clorofila.

En los resultados para el tratamiento con 10 ppm de TiO_2 se observa un decremento en la concentración de clorofila del 40% en la tercera semana de tratamiento, mientras que para la sexta semana de tratamiento se muestra una disminución del 66% de su concentración.

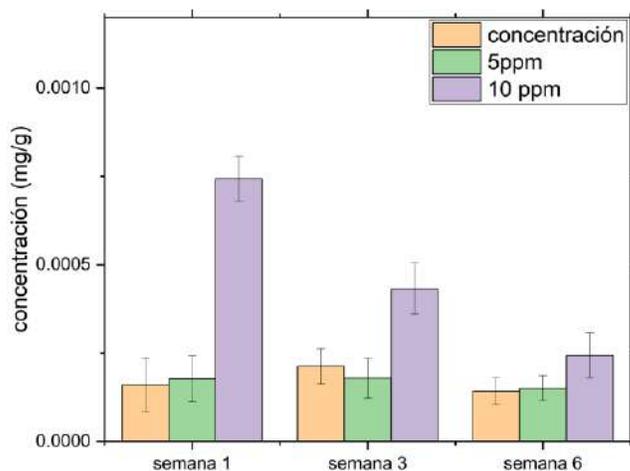


Figura 22. Concentración de clorofila para estevia tratada durante 6 semanas.

Se determinó la presencia de carotenoides ya que es un metabolito secundario, pigmento orgánico del grupo de isoprenoides que va relacionado fuertemente con clorofila, además de poseer gran capacidad antioxidante en las plantas de estevia. Se observa en la Figura 24., que, en la tercera semana del tratamiento 5 ppm de TiO_2 hubo una reducción del 41.17% en el contenido de carotenoides mientras que en la sexta semana se observó un aumento del 27% en la concentración en comparación con la tercera semana.

Por otro lado, al tratar las plantas con 10 ppm de TiO_2 , se observa un decaimiento del 27.58% del contenido de carotenoides, mientras que en la sexta semana, se reportó un aumento del 26.98% en comparación con la tercera semana. Estos resultados se pueden relacionar directamente con los resultados de capacidad antioxidante de las plantas, debido a que los carotenoides son el principal compuesto responsable de la actividad antioxidante de la estevia.[79]

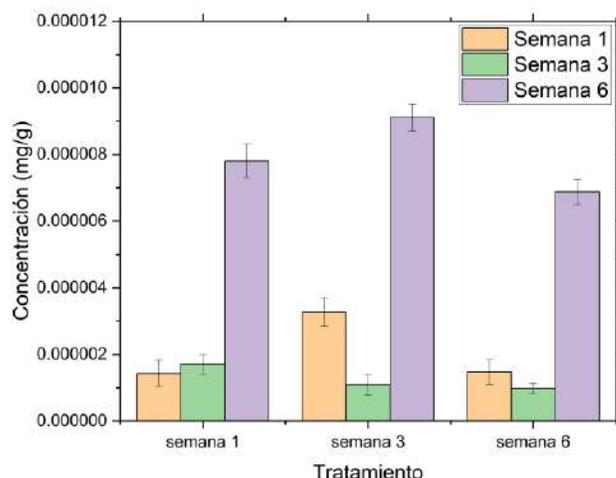


Figura 23. Concentración de carotenoides para estevia tratada durante 6 semanas.

7 Conclusiones

Los análisis realizados por medio del SEM y TEM mostraron que se obtuvieron nanopartículas de morfología esférica-amorfa para el método de síntesis tradicional sol-gel, demostrando que el método de síntesis es efectivo. De igual forma, el análisis XRD corroboró la presencia de la fase cristalina anatasa, presentando las señales características para dicha fase, siendo muy similar con respecto a su ficha JCPDS, sin embargo, se mostraron posibles impurezas, siendo la fase brookita. La medición del tamaño de cristalito muestra que las nanopartículas sintetizadas por el método de Sol-Gel tienen un tamaño de cristalito promedio de 8.7 nm por el método de Sherrer y de 10.2 nm por el método de Williamson-Hall.

La espectroscopía Raman confirmó la presencia de la fase cristalina Anatasa por medio de la síntesis por sol-gel. Además, se ha observado una señal de la fase brookita, alrededor de 545 cm^{-1} . Esta observación podría ser atribuida a dos posibles factores principales. En primer lugar, la metodología de síntesis empleada para la obtención de las muestras podría haber contribuido a la generación de estas características inusuales en los patrones de planos preferenciales. En segundo lugar, la temperatura a la que las muestras fueron sometidas también podría haber influido en la formación de estas peculiaridades en los resultados Raman.

En las pruebas *in vivo*, con el suelo recuperado de las macetas, se observó una disminución en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para ambas concentraciones de TiO_2 al igual que con el control, aunque no está claro si esto puede deberse a la aplicación del dióxido de titanio y su actividad antimicrobiana o a la actividad del agua, la cual es responsable del aumento o decremento del número de microorganismos. Por otro lado, las pruebas de minimacetas mostraron que no hubo un efecto significativo en el número de UFC al aplicar la solución de TiO_2 a pesar de tener dos concentraciones diferentes, aunque esto se puede deber a que al aplicar CN (caldo nutritivo) les otorga todos los nutrientes

necesarios a las bacterias, provocando que las bacterias se adapten a su nuevo ecosistema y se puedan seguir reproduciendo con normalidad a pesar de estar en contacto con el TiO_2 a distintas concentraciones.

El resultado del estudio *in vivo* demostró que la aplicación de nanopartículas de TiO_2 conlleva un impacto significativamente positivo en el desarrollo físico de las plantas. Específicamente, se observó una mejora notable en la longitud del tallo y la altura de las plantas tratadas en comparación con el grupo de control no tratado. Entre las diversas concentraciones evaluadas, se destacó de manera prominente el grupo expuesto a una concentración de 10 ppm de TiO_2 , el cual exhibió un rendimiento óptimo en términos de crecimiento vegetal. Este grupo alcanzó resultados superiores, evidenciando un aumento excepcional del 129% en su tasa de crecimiento durante el periodo analizado, en comparación con las mediciones tomadas en la primera semana. Esta mejora sugiere que la utilización de concentraciones más elevadas de TiO_2 , implementadas en intervalos temporales más cortos, ejerce un impacto altamente positivo en el proceso de crecimiento de las plantas.

El análisis de la capacidad antioxidante por medio del % de inhibición de los radicales DPPH & ABTS en las plantas tratadas con TiO_2 mostró que estas pasan por un periodo de adaptación debido a que el TiO_2 genera que las plantas sufran de estrés abiótico, aumentando así sus nutrientes después de pasar por un periodo de adaptación. Estos resultados sugieren que el estrés inducido por el dióxido de titanio puede afectar el rendimiento inicial de las plantas, pero a medida que se adaptan y se recuperan, su capacidad antioxidante se ve fortalecida.

De igual forma, la concentración de clorofila y carotenoides se vio disminuida junto con la capacidad antioxidante de las plantas, esto debido a que la clorofila y carotenoides son parte de este proceso de estrés y adaptación que deben pasar las plantas. La capacidad antioxidante está directamente ligada a la concentración de carotenoides, siendo estos uno de los componentes responsables de la gran capacidad antioxidante de la estevia, siendo lógico sus resultados estén directamente relacionados.

8 Perspectivas

Los efectos observados como la capacidad antioxidante o la producción de clorofila de las plantas al estar en contacto con una concentración de TiO_2 por un tiempo en específico muestra que estas deben pasar primero por un periodo de adaptación, mostrando un aumento de sus propiedades fisicoquímicas en la sexta semana de tratamiento. Con lo anterior, se propone añadir más concentraciones y aumentar el tiempo de tratamiento con el fin de comprender de una manera más exacta el efecto conforme aumenta el tiempo de tratamiento y por supuesto, las concentraciones, pudiendo realizar curvas de calibración cada semana para llevar un control de cómo se adapta la planta al TiO_2 .

De igual forma, se propone que con la parte *in vitro* de microbiología, aumentar el número de concentraciones y tratamientos, además de colocar diferentes bacterias conocidas con el fin de conocer sus condiciones óptimas de crecimiento, como lo es la actividad del agua.

Por último, la producción de metabolitos secundarios es una parte importante para tomar en cuenta en las plantas, por lo que se propone una investigación más profunda sobre cómo se podrían afectar estos por el tratamiento con el TiO_2 .

9 Referencias

1. Yokoyama T., Masuda H., Suzuki M., Ehara K., Nogi K., Fuji M., Kufui T., Suzuki H., Tatami J., Hayashi K. and Toda K., “Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles” in *Nanoparticle Technology Handbook*, 2018.
2. De, M., Ghosh, P. S., & Rotello, V. M.. “Applications of Nanoparticles in Biology *Advanced Materials*”, 20(22), 4225–4241, 2017. doi:10.1002/adma.200703183
3. Shafi A., Qadir J., Sabir S., Zain Khan M., & Rahman M. M. *Nanoagriculture: A Holistic Approach for Sustainable Development of Agriculture. Handbook of Nanomaterials and Nanocomposites for Energy and Environmental Applications*, 1–16. 2020. doi:10.1007/978-3-030-11155-7_48-1
4. Castro-Restrepo D. “Nanotecnología en la agricultura” in *Bionatura*, 2017. DOI: 10.21931/RB/2017.03.03.9
5. Wang, Z., Yue, L., Dhankher, O. P., & Xing, B. “Nano-enabled improvements of growth and nutritional quality in food plants driven by rhizosphere processes” in *Environment International*, 142, 105831, 2020. doi:10.1016/j.envint.2020.105831
6. J.S. Duhan, R. Kumar, N. Kumar, P. Kaur, K.Nera & S. Duhan, “Nanotechnology: The new perspective in precisión agriculture” in *Biotechnology Reports*, 2017. Doi : 10.1016/j.btre.2017.03.002.
7. Mejias,J. H. Salazar,F. Pérez Amaro,L. Hube,S. Rodriguez,M. Alfaro,M. *Frontiers in Environmental Science. Nitrogen nanofertilizers,nitrogen losses,nitrogen use efficiency,nanofertilizers in grasslands, Nitrogen based nanomaterials*. 2021. 10.3389/fenvs.2021.635114
8. Chaud M., Souto E.B., Zielinska A., Severino P., Batain F., Oliveira-Junio J., Alves T., “Nanopesticides in Agriculture: Benefits and Challenge in Agricultural Productivity, Toxicological Risks to Human Heal and Elvironment. In *Toxics*, 2021, 9,131. <https://doi.org/10.3390/toxics9060131>
9. Muzammil Hussain, Nosheen Zahra, Tao Lang, Muhammad Zain, Mubashar Raza, Noman Shakoor, Muhammad Adeel, Haichao Zhou, Integrating nanotechnology with plant microbiome for next-generation crop health, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 196, 2023, Pages 703-711, ISSN 0981-9428, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.022>.
10. Cheng, H. N., Klasson, K. T., Asakura, T., & Wu, Q. “Nanotechnology in Agriculture” in *Nanotechnology: Delivering on the Promise Volume 2*, 233–242, 2016. doi:10.1021/bk-2016-1224.ch012
11. Chavan S., Sarangdhar V., Nadanathangam V. “Toxicological effects of TiO2 nanoparticles on plant growth promoting soil bacteria”, 2020. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.01.003>

12. García-Ovando A.E., Ramírez Piña J.E., Esquivel Naranjo E.U., Cervantes Chávez J.A., Esquivel K. “Biosynthesized nanoparticles and implications by their use in crops: Effects over physiology, action mechanisms, plant stress responses and toxicity. In *Plant Stress*. 2022. 100109. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100109>
13. Kumar A., & Dubey A. Rhizosphere Microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. *Journal of Advanced Research*. 2020. doi:10.1016/j.jare.2020.04.014
14. Peteliuk V., RYBCHUK I., Bayliak m., Storey K.B., Lushchak O. “NATURAL SWEETENER STEVIA REBAUDIANA: FUNCTIONALITIES, HEALTH BENEFITS AND POTENTIAL RISKS”, *EXCLI Journal* 2021;20:1412-1430. Doi: <http://dx.doi.org/10.17179/excli2021-4211>
15. Saleh, T.A. “Nanomaterials: classification, properties and enviromental toxicities” en *Environ. Technol. Innov.* 2020, 101067.
16. Khan I., Saeed K., & Khan I. “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities”. In *Arabian Journal of Chemistry*. 2019. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
17. Facure H.M., Schneider R., Mercante L.A., Correa D.S. “A review on Graphene quantum dots and their nanocomposites: from laboratory synthesis towards agricultural and environmental applications” en *Science: Nano*, 7-812-9, 2020, doi: 10.1039/d0en00787k.
18. Shen J., Shafiq M., Ma M., Chen H. “Synthesis and Surface Engineering of Inorganic Nanomaterials Based on Microfluidic Technology” in *Nanomaterials (Basel)*, 2020, doi: 10.3390/nano10061177.
19. Domingues J.M., Miranda C.S., Homen N.C., Felgueiras H.P., Antunes J.C., “Nanoparticle Synthesis and Their Integration into Polymer-Based Fibers for Biomedical Applications”, *Biomedicines*,11,1862, 2023. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071862>
20. S. DIN, “Applications of nanocomposites, a review”, 2018, doi: 10.24294/can.v0i0875
21. Thiagarajan V., Ramasubbu S. “Fate and Behaviour of TiO₂ Nanoparticles in the Soil: Their Impact on Staple Food Crops” . Springer. *Water Air Soil Pollut*, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05219-8>
22. Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., & Novak, S. “Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?” in *Radiology and Oncology*, 45(4), 2011. doi:10.2478/v10019-011-0037-0
23. Ijaz, M., & Zafar, M. Titanium dioxide nanostructures as efficient photocatalyst: Progress, challenges and perspective. *International Journal of Energy Research*. 2020. doi:10.1002/er.6079
24. Stetsyk N.V., Antonyuk V.G. & Rudka M.M. “Semiconductor Nanomaterials and Nanocrystals”. In *Nano-Electron. Phys.*, vol. 7, 2015.

25. Singh M. K., & Mehata M. S.. Phase-dependent Optical and Photocatalytic Performance of Synthesized Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles. *Optik*, 163011. 2019. doi:10.1016/j.ijleo.2019.163011
26. Saldivar, R.H., Argüello, B., Villareal, G., Reyes, I. “Potencial de la nanotecnología en la agricultura”. Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), México, 2019. <https://doi.org/10.15174/au.2017.1575>
27. Sampathkumar, K., Tan, K. X., & Loo, S. C. J. “Developing Nano-Delivery Systems for Agriculture and Food Applications with Nature-Derived Polymers”. *iScience*, 101055, 2020, doi:10.1016/j.isci.2020.101055
28. Syed Anees Ahmad, Sabya Sachi Das, Ayesha Khatoon, Mohammed Tahir Ansari, Mohd. Afzal, Md Saquib Hasnain, Amit Kumar Nayak, Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review, *Materials Science for Energy Technologies*, Volume 3, 2020, Pages 756-769, ISSN 2589-2991, <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.002>.
29. Dicastillo, C. Correa, M. Martínez, F. Streitt, C. & Galotto, M.J.” Antimicrobial Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles”. CEDENNA (Center for the Development of Nanoscience and Nanotechnology), University of Santiago de Chile (USACH), Santiago, Chile, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.90891
30. Shafi, A., Qadir, J., Sabir, S., Zain Khan, M., Rahman, M.M. (2021). Nanoagriculture: A Holistic Approach for Sustainable Development of Agriculture. In: Kharissova, O.V., Torres-Martínez, L.M., Kharisov, B.I. (eds) *Handbook of Nanomaterials and Nanocomposites for Energy and Environmental Applications*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36268-3_48
31. Wang, L., Hu, C., & Shao, L. “The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future” in *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 1227–1249, 2017. doi:10.2147/ijn.s121956
32. Henao C.P., Montes V., Sierra R. “Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio” en *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 2016.
33. Matthias Erb , Daniel J. Kliebenstein, Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy, *Plant Physiology*, Volume 184, Issue 1, September 2020, Pages 39–52, <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
34. Mohammed Sharif Swallah, He Sun, Raïfatou Affoh, Hongling Fu, Hansong Yu, "Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits", *International Journal of Food Science*, vol. 2020, Article ID 9081686, 8 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9081686>
35. Shahid Ali, Asif Mehmood, Naeem Khan, "Uptake, Translocation, and Consequences of Nanomaterials on Plant Growth and Stress Adaptation", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2021, Article ID 6677616, 17 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6677616>

36. U. Gramam et al. "From Dose to response: In Vivo Nanoparticle Processing and Potential Toxicity, *Advances in Experimental Medicine and Biology*", vol. 947, pp.71-100, 2017.
37. Chukwuebuka E., Vijaykumar K. P., Jaison J., Shahira M. E., Kingsley C. P., Charles O.A., Johra K., Eugene N. O., Chukwuemelie Z. U, Muhammad A., Mervat S. I., Nihal M. E., Chinaza G. A, Kaliyaperumal S., Habibu T., Uchenna E., Mohammed M., Jonathan C. I., Michael C. O., Nebechi J. E., Chukwudi J. C., Chinwe G. I., "Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology", *Journal of Toxicology*, vol. 2021, Article ID 9954443, 21 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>
38. Hassan S.S., Hasary H.J., "Nanotoxicology: An Integrative Environmental Challenge". *Al-Rafidain J Med Sci.* 2022;3:41-47. Doi: <https://doi.org/10.54133/ajms.v3i.80>
39. Schmid, O., & Stoeger, T. "Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung" in *Journal of Aerosol Science*, 99, 133–143, 2016. doi:10.1016/j.jaerosci.2015.12.00
40. Kumah, E.A., Fopa, R.D., Harati, S. et al. Human and environmental impacts of nanoparticles: a scoping review of the current literature. *BMC Public Health* 23, 1059 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12889-023-15958-4>
41. Narla, S., & Lim, H. W. Sunscreen: FDA Regulation, and Environmental and Health Impact. *Photochemical & Photobiological Sciences.* 2019. doi:10.1039/c9pp00366e
42. Cox A., Venkatachalam P., Sahi S., & Sharma N. "Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research" in *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 147–163, 2016. doi:10.1016/j.plaphy.2016.05.022
43. Demir E., Kaya N., & Kaya B. "Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by comet assay" in *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 31-39, 2014. doi: 10.3906/biy-1306-11
44. Samuel P., Ayoob K., Magnuson B., Wolver-Rieck U., Jeppesen P., Rogers P., Rowalnd I., & Mathews R. Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential. *The Journal of Nutrition*, 2019. doi:10.1093/jn/nxy102
45. Sharma A., Raina M., Kumar D. et al. Harnessing phytomicrobiome signals for phytopathogenic stress management. *J Biosci* 47, 6, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00240-9>
46. Kong Z and Liu H. Modification of Rhizosphere Microbial Communities: A Possible Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Enhancing Plant Growth and Fitness. *Front. Plant Sci.* 13:920813.2022. doi: 10.3389/fpls.2022.920813
47. Kent A. D., & Triplett E. W. "Microbial Communities and Their Interactions in Soil and Rhizosphere Ecosystems" in *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 211–236, 2020. doi:10.1146/annurev.micro.56.0123

48. Wang Z., Yue L., Dhankher O. P., & Xing B. “Nano-enabled improvements of growth and nutritional quality in food plants driven by rhizosphere processes” in *Environment International*, 142, 105831, 2020. doi:10.1016/j.envint.2020.105831
49. Kumah, E.A., Fopa, R.D., Harati, S. et al. Human and environmental impacts of nanoparticles: a scoping review of the current literature. *BMC Public Health* 23, 1059 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12889-023-15958-4>
50. Vicente Rodríguez-González, Chiaki Terashima, Akira Fujishima, Applications of photocatalytic titanium dioxide-based nanomaterials in sustainable agriculture, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, Volume 40, 2019, Pages 49-67, ISSN 1389-5567, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.06.001>.
51. Slavin Y. N., Asnis J., Häfeli U. O., & Bach H. “Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity”. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 2017. doi:10.1186/s12951-017-0308-z
52. Dubey, A., Malla, M.A. & Kumar, A. Taxonomical and functional bacterial community profiling in disease-resistant and disease-susceptible soybean cultivars. *Braz J Microbiol* 53, 1355–1370 (2022). <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00746-w>
53. Liu Q, Cheng L, Nian H, Jin J, Lian T. Linking plant functional genes to rhizosphere microbes: a review. *Plant Biotechnol J*. 2023 May;21(5):902-917. doi: 10.1111/pbi.13950. Epub 2022 Nov 21. PMID: 36271765; PMCID: PMC10106864.
54. Lyu, D., Backer, R., Robinson, W. G., & Smith, D. L. “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Cannabis Production: Yield” in *Cannabinoid Profile and Disease Resistance*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.01761
55. Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... Smith, D. L. “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture” in *Frontiers in Plant Science*, 9, 2019. doi:10.3389/fpls.2018.01473
56. Samuel P., Ayoob K., Magnuson B., Wolver-Rieck U., Jeppesen P., Rogers P., Rowalnd I., & Mathews R. *Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential*. *The Journal of Nutrition*, 2019. doi:10.1093/jn/nxy102
57. Peteliuk V, Rybchuk L, Bayliak M, Storey KB, Lushchak O. Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI J*. 2021 Sep 22;20:1412-1430. doi: 10.17179/excli2021-4211. PMID: 34803554; PMCID: PMC8600158.
58. Tuleja M., Dziurka M., Musial K., Capecka E., Libik-Konieczny M. “Physiological aspect of sexual reproductive potential of *Stevia rebaudiana*”

- Bertoni cultivated in moderate climate conditions. In *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA: Series Botanica*. Vol. 62. Soppl. 1. 2020.
59. Koubaa M., Roselló-Soto E., Sic Zlabur J., Rezek Jambrak, A., Brncic, M., Grimi N., Boussetta N., & Barba F. J. “Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertona” in *Journal of Africultural and Food Chemistry*, 2015.
 60. : Twaij B.M., Hasan M.N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *Int. J. Plant Biol.* 2022, 13, 4–14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>
 61. Teoh E. S. “Secondary Metabolites of Plants. Medicinal Orchids of Asia”, 59–73, 2016. doi:10.1007/978-3-319-24274-3_5
 62. Castillo P., Perea I., Arellano J. & Valencia S. Qué son y para qué sirven los METABOLITOS de las plantas. *Ciencia y desarrollo. CONACYT*. Link: <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=227%C2%BB>
 63. Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2020). Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112891. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112891
 64. Gulcin, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* 94, 651–715 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
 65. Olszowy M. “What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?” in *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019. doi:10.1016/j.plaphy.2019.09.039
 66. Chaves, Santiago & Alías. “Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used”. *Antioxidants*, 9(1), 76, 2020. doi:10.3390/antiox9010076
 67. RICHMOND, A. “Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view”. *J. Appl. Phycol.*12: p 441-451, 2020.
 68. Maoka, T. Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med* 74, 1–16 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
 69. Meléndez-Martínez A. J., Vicario I. M., & Heredia F. “Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides” de *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 149-155.
 70. Irshad M. A., Nawaz R., Ziaur Rehman M., Imran M., Ahmad M. J., Ahmad S., Ali S. “Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles by chemical and green methods and their antifungal activities against wheat rust. “ *Chemosphere*”, 127352., 2020. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.12
 71. Sundrarajan ., Bama K., Bhavani M., Jegatheeswaran S., Ambika S., Sangli A., Nithya P., “Obtaining titanium dioxide nanoparticles with spherical shape and antimicrobial properties using *M. citrifolia* leaves extract by hydrothermal method. *Journal of Phtotochemistry & Photobiology*. 2021

72. Ahmad M.M., Mushtaq S., Al Qahtani H.S., Sedky, A., Alam, M.W. “Investigation of TiO₂ Nanoparticles Synthesized by Sol-Gel Method for Effectual Photodegradation, Oxidation and Reduction Reaction.” In *Crystal* 2021, 11, 1456. <https://doi.org/10.3390/cryst11121456>
73. Theivasanthi T., Alagar M. Titanium dioxide (TiO₂) Nanoparticles – XRD Analyses – An Insight. 2013.
74. Iliev M. N., Hadjiev V. G., & Litvinchuk A. P. Raman and infrared spectra of brookite (TiO₂): Experiment and theory. *Vibrational Spectroscopy*, 64, 148–152. 2013. doi:10.1016/j.vibspec.2012.08.003
75. Tapia M.S., Alzamora S. M., Chirife J., Effects of Water Activity (A_w) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation, 323-325. Doi: <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch14>
76. Barani M., Zeeshan, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Farooq, M.A., Rahdar, A., Jha N.K., Sargazi S., Gupta P.K.; Thakur V.K. Nanomaterials in the Management of Gram-Negative Bacterial Infections. *Nanomaterials* 2021, 11, 2535. <https://doi.org/10.3390/nano11102535>
77. Lara Oviedo, G.A., Navarro, M.C. and Altamiranda, J.A. Study of photoreactivation in microbiological crops obtained from microbial loading of the surface of strawberries subject to different doses of short-wave UV-C ultraviolet light. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. 5, 1, 2018, 32–40. DOI:<https://doi.org/10.23850/24220582.1148>.
78. Cevik, S. TiO₂ nanoparticles alleviates the effects of drought stress in tomato seedlings. *Bragantia*, 82, e20220203. 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20220203>
79. Putnik P., Bezuk I., Barba F. J., Lorenzo J. M., Polunić I., & Kovačević Bursać D. Sugar reduction: *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural sweetener. *Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability*, 123–152. 2020. doi:10.1016/b978-0-12-817226-1.00005-9

10 Anexos

10.1 Plantas de estevia

Controles

Semana 1



Semana 3



Semana 6



Figura 24. Plantas control a lo largo del tratamiento.

Plantas tratadas con 5 ppm TiO_2

Semana 1



Semana 3



Semana 6



Figura 25. Plantas tratadas con 5 ppm.

Plantas tratadas con 10 ppm TiO₂

Semana 1



Semana 3



Semana 6



Figura 26. Plantas tratadas con 10 ppm.

10.2 Curvas de calibración de Trolox

Figura 28 a) Curva de calibración para DPPH y b) curva de calibración para ABTS

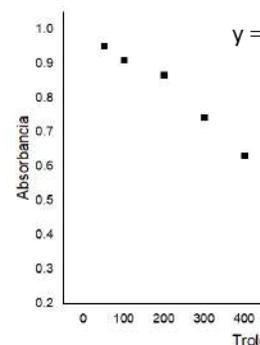
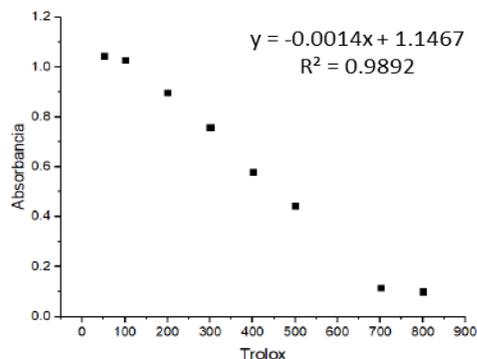


Figura 27. Curvas de calibración de Trolox, a) DPPH, b) ABTS

10.3 Capacidad Antioxidante

Resultados DPPH

Tabla 6. Resultados de la capacidad antioxidante por DPPH S1.

SEMANA 1		
4	6	14
91.0895421	89.2398266	91.7458928
90.0632483	90.313855	89.8126417
90.8508692	89.87231	89.8245754
1	9	10
88.3702738	85.8670143	90.0782269
85.7105606	86.1147327	89.5567145
85.1499348	82.8422425	85.6062581
11	12	13
86.1408083	84.2112125	86.2059974
85.0325945	92.2816167	86.2842243
84.8500652	80.7953064	84.9543677

Tabla 7. Resultados de la capacidad antioxidante por DPPH S3.

SEMANA 3		
4	6	14
88.0744766	92.2027044	88.2682506
85.1847171	89.7173428	90.2902397
89.7847424	89.5488437	90.610388
1	9	10
14.7689456	4.43152618	39.3108387
35.4606344	37.8364716	81.107039
64.2402797	66.1611694	87.1982813

11	12	13
56.177598	59.7076541	80.7700409
59.7076541	51.341674	88.2514006
61.8644425	54.0123847	87.3920553

Tabla 8. Resultados de la DPPH S6.

capacidad antioxidante por

SEMANA 6		
4	6	14
54.1872245	91.9742122	89.158608
85.3956977	92.5794356	84.185251
78.4093152	94.0924939	83.8563252
1	9	10
77.2909677	80.3170844	90.3953687
81.3301756	83.6589698	92.0136833
78.1461746	82.9221762	90.4743109
11	12	13
58.01592	84.4220775	89.5138478
79.1592658	88.5139136	85.8561937
77.1857115	87.6850207	87.1192685

Resultados ABTS

Tabla 9. Resultados de la capacidad antioxidante por ABTS S1.

SEMANA 1		
4	6	14
94.7032395	92.2440293	89.7257035
98.2620005	87.9404114	89.1581934
95.2471033	87.8340033	86.4979901
1	9	10
79.6351316	98.9210321	99.1712275
76.194944	98.9106072	99.2754756
61.51681	99.3171749	99.254626
11	12	13
98.5561637	64.7380766	98.7333855
97.3156112	84.524368	37.3625228
98.7333855	91.3004952	96.6171488

Tabla 10. Resultados de la capacidad antioxidante por ABTS S3.

SEMANA 3		
4	6	14
97.4818217	95.7826253	76.6169154
85.5568312	82.1125144	98.2931496
98.5993111	95.50708	96.5633372
1	9	10
50.8993494	39.2652124	75.101416
68.6873326	97.8645235	96.8848067

84.2556449	89.5063146	98.4615385
11	12	13
51.3738997	87.2407195	73.9686184
50.3788749	90.0267891	55.3539992
97.6042863	96.6092614	95.0478377

Tabla 11. Resultados de la capacidad antioxidante por ABTS S6.

SEMANA 6		
4	6	14
56.0415004	59.5690343	64.5810056
85.9696728	83.1763767	59.6648045
95.5147646	60.415004	40.4469274
1	9	10
71.1560974	69.1939346	70.1436552
79.9880287	91.6775738	77.8371907
86.3516361	83.1580208	88.2569832
11	12	13
98.8507582	99.2338388	91.6360734
98.5634477	98.1963288	85.7142857
99.6009577	96.7757382	91.9393456