



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

APLICACIÓN DE ÓXIDOS SEMICONDUCTORES NANOESTRUCTURADOS (TiO_2 y Ag-TiO_2) COMO ADITIVO EN EL PROCESO GERMINATIVO DE ALFALFA.

TESIS

Para obtener el Grado de ingeniero
en nanotecnología

P R E S E N T A

Alexis Martínez Barras

DIRECTOR

Dra. Ana Angélica Feregrino
Pérez

Co-DIRECTOR

Dra. Karen Esquivel Escalante

Santiago de Querétaro, Querétaro. 2024





Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



APLICACIÓN DE ÓXIDOS SEMICONDUCTORES
NANOESTRUCTURADOS (TiO_2 y Ag-TiO_2) COMO
ADITIVO EN EL PROCESO GERMINATIVO DE ALFALFA.

por

Alexis Martínez Barras

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

Clave RI: IGLIC-272288



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de ingeniería
Ingeniería en nanotecnología



**APLICACIÓN DE ÓXIDOS SEMICONDUCTORES NANOESTRUCTURADOS
(TiO₂ y Ag-TiO₂) COMO ADITIVO EN EL PROCESO GERMINATIVO DE
ALFALFA.**

T E S I S

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

Presenta

Alexis Martínez Barras

Dirigida por

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

SINODALES

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Presidente

Dra. Karen Esquivel Escalante
Secretario

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Vocal

Dr. Cristian Josué Mendoza Meneses
Sinodal

Centro Universitario, Querétaro Qro..

RESUMEN.

El presente trabajo muestra los efectos que provocan la exposición de semillas a medios ricos en nanopartículas de Ag-TiO₂ y TiO₂ sobre el proceso germinativo, mediante una técnica conocida como “Seed priming”, misma que consiste en imbibir o remojar las semillas en medios como agua, peróxido de hidrógeno o medios promotores de crecimiento, con la finalidad de acelerar la germinación y en algunos casos mejorando la calidad de los germinados. En este ensayo se probaron 2 tipos de nanopartículas como se mencionó anteriormente, sobre alfalfa (*medicago sativa*). Dichas nanopartículas fueron sintetizadas mediante la técnica de sol gel, obteniendo tamaños de cristalito aproximadamente de 20 nm (TiO₂) y 14 nm (Ag-TiO₂). Las semillas fueron expuestas en un rango de concentraciones (1, 5, 10, 15 ppm) durante un periodo de 2 hr. La intención del desarrollo, planeación y ejecución del experimento se estableció considerando la evaluación del efecto toxicológico procedente del aumento en las concentraciones, características de nanopartícula; como morfología, fase cristalina y dopante, de la misma forma el método de exposición de las semillas, el tiempo de exposición. La caracterización de las nanopartículas se realizó por microscopía electrónica de transmisión, espectroscopía Raman y XRD. El perfil toxicológico se evaluó mediante la medición de parámetros morfológicos; como porcentaje de germinación, peso fresco, longitud de radícula, tamaño de hoja, así como pigmentación (clorofila), metabólico como; fenoles y flavonoides totales, así como % de inhibición mediante radical DPPH y ABTS, enzimático como; evaluación de actividad de las enzimas super óxido dismutasa, fenilalanina amonio liasa y catalasa.

El efecto observado derivado de la exposición de las semillas en la posterior etapa de germinación fue marcado en la longitud de radícula, tamaño de hojas, pero no se vio afectado el peso fresco. En cuanto al perfil metabólico, los resultados arrojaron incrementos significativos de fenoles y flavonoides totales dependientes de la concentración para el tratamiento con TiO₂.

Palabras clave: Dióxido de titanio, metabolitos secundarios, actividad antioxidante, seed priming, Germinados.

SUMMARY.

The present study shows the effects of exposing seeds to Ag-TiO₂ and TiO₂ nanoparticle-rich media on the germination process, using a technique known as "Seed priming", which consists of imbibing or soaking the seeds in media such as water, hydrogen peroxide or growth promoter media, with the aim of accelerating germination and in some cases improving the quality of the germinated seeds. In this trial, 2 types of nanoparticles were tested as mentioned above, on alfalfa (*medicago sativa*). These nanoparticles were synthesized using the sol gel technique, obtaining crystallite sizes of approximately 20 nm (TiO₂) and 14 nm (Ag-TiO₂). The seeds were exposed to a range of concentrations (1, 5, 10, 15 ppm) for a period of 2 hr. The purpose of the development, planning and execution of the experiment was established considering the evaluation of the toxicological effect coming from the increase in concentrations, nanoparticle characteristics; such as morphology, crystalline phase and dopant, in the same way the method of exposure of the seeds, the exposure time. The characterization of the nanoparticles was performed by transmission electron microscopy, Raman spectroscopy and XRD. The toxicological profile was evaluated by measuring morphological parameters such as germination percentage, fresh weight, radicle length, leaf size and pigmentation (chlorophyll), metabolic parameters such as total phenols and flavonoids, as well as % inhibition by DPPH radical and ABTS, enzymatic parameters such as super oxide dismutase, phenylalanine ammonium lyase and catalase enzyme activity.

The observed effect of seed exposure at the later germination stage was marked in radicle length, leaf size, but fresh weight was not affected. Regarding the metabolic profile, the results showed significant concentration-dependent increases in total phenols and flavonoids for the TiO₂ treatment.

Key words: Titanium dioxide, Secondary metabolites, Antioxidant activity, Seed priming, Sprouts.

DEDICATORIA.

A mi hermano, Leo.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres, que siempre me apoyaron en cada obstáculo y que siempre escucharon con atención mis inquietudes y alegrías.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a los profesores de la carrera de ingeniería en nanotecnología, así como a mis compañeros de laboratorio, que siempre me apoyaron en cada uno de los retos que se presentaron.

A la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación, así como ser parte del grupo de trabajo, en donde tuve la oportunidad de hacer grandes amistades y a desarrollar mi gusto por la investigación.

A la Dra. Karen Esquivel por brindarme la oportunidad y confianza para realizar esta investigación, así como su paciencia y guía. De igual manera por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo en dónde tuve la oportunidad de adquirir diversas habilidades.

A la Dra. Rosalinda, por brindarme un espacio en la facultad de Química para continuar mis experimentos.

A la maestra Rosalía Machuca, que me brindó su ayuda y guía durante gran parte de la carrera, así como la escritura de la tesis. Le tengo un aprecio muy especial por la calidez humana y comprensión que me brindó.

A mis compañeros de clase Solecito, Johan, Iván, Avalos, Lorena, Irasemiau, Yess, Isaí, Héctor sin excluir a ningún compañero del grupo 22. Así como a mis compañeras de laboratorio Valeria, Luz y Mariana “Teté”.

A Iván López, quien conocí al inicio de la carrera y se han convertido en un gran amigo que me ha apoyado en los momentos de mayor conflicto.

A mis sinodales que sin su apoyo y tiempo dedicado a en este proyecto, no habría sido posible concluir esta etapa académica tan importante.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.	14
3. MARCO TEÓRICO.	15
3.1 Nanopartículas.....	15
3.2 Nanopartículas a base de carbono.	16
3.3 Nanomateriales orgánicos.	17
3.4 Nanomateriales inorgánicos.	18
3.5 Nanomateriales compuestos o compósitos.	19
3.6 Óxidos semiconductores.....	19
3.6.1 Óxidos semiconductores como agentes promotores de crecimiento en germinados.....	21
3.7 Agricultura	22
3.7.1 Nanofertilizantes.....	23
3.7.2 Efectos de Nanofertilizantes.	24
3.8 Estrés biótico y abiótico.....	25
3.8.1 Nanopartículas como generadores de estrés.....	25
3.8.2 Estrés abiótico generado por metales.	27
3.9 Especies reactivas de oxígeno.	28
3.9.1 Actividad antioxidante.....	30
3.10 Metabolitos secundarios.	32
3.10.1 Terpenos.	33
3.10.2 Fenoles.	34
3.10.3 Alcaloides	35
3.11 Germinados.....	36
4. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	38
5. PLANTEAMIENTO TEÓRICO.	38
5.1 Hipótesis.....	38
5.2 Objetivo general.....	38
5.3. Objetivos específicos	39
5.4 Justificación.....	39
6. METODOLOGÍA.	41
6.1 Materiales.	41
6.2 Síntesis de nanopartículas de TiO ₂ por método Sol-gel.	41
6.3 Caracterización fisicoquímica de los materiales.....	43

6.4	Desarrollo de germinación.	43
6.5	Porcentaje de germinación.	44
6.6	Preparación de extractos.	44
6.7	Cuantificación de flavonoides totales.	44
6.8	Cuantificación de fenoles.	45
6.9	Determinación de capacidad antioxidante mediante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).	46
6.10	Determinación de capacidad antioxidante mediante ABTS (Ácido 2,2-azino-bis-3-etiltiazolina bencenosulfónico-6).	46
7.0	Actividad enzimática.	47
7.1	Fenilalanina amonio liasa.	47
7.2	Superóxido dismutasa.	48
7.3	Catalasa.	48
7.	RESULTADOS.	48
7.1.0	Caracterización de Nanopartículas.	48
7.1.1	Microscopía electrónica de Barrido (SEM).	48
7.1.2	Difracción de rayos (XRD).	49
7.1.3	Espectroscopía Raman.	51
7.2.0	Morfología de germinados.	52
7.2.1	Porcentaje de germinación.	52
7.2.2	Peso fresco.	52
7.2.3	Longitud de radícula.	55
7.2.4	Clorofila (mediciones SPAD).	57
7.2.5	Longitud y anchura de hojas.	60
7.2.6	Ancho de hojas.	60
7.2.7	Longitud de hojas.	62
8.0	Perfil Metabólico en germinados de alfalfa tratados con nanopartículas TiO ₂ y Ag-TiO ₂ , sintetizadas por medio de sol gel.	65
8.1.1	Curvas de Calibración empleadas en la cuantificación de metabolitos secundarios y actividad antioxidante.	65
8.1.1.1	Curva estándar para determinación de fenoles totales.	65
8.1.1.2	Curva estándar para determinación de flavonoides totales.	66
8.1.2.1	Estándar de calibración para determinación de actividad antioxidante mediante inhibición de radical ABTS ^{•+}	67
8.1.2.2	Estándar de calibración para determinación de actividad antioxidante mediante inhibición de radical DPPH ^{•+}	68
8.2.1	Determinación de fenoles totales en germinados con tratamiento de TiO ₂ y Ag-TiO ₂	69

8.2.2 Determinación de flavonoides totales en germinados con tratamiento de TiO_2 y Ag-TiO_2	70
8.2.3 Determinación de Capacidad antioxidante en germinados con tratamiento de TiO_2 y Ag-TiO_2	72
8.2.4 Actividad estabilizadora de radical DPPH^{*+} en germinados tratados con TiO_2 y Ag-TiO_2	72
8.2.5 Actividad estabilizadora de radical ABTS^{*+} en germinados tratados con TiO_2 y Ag-TiO_2	74
9.0 Actividad de las enzimas Super óxido dismutasa (SOD), Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) y Catalasa (CAT).	77
8. DISCUSIÓN.....	79
9. CONCLUSIONES.....	86
10. PERSPECTIVAS.....	87
11.REFERENCIAS.....	88
12. ANEXOS	104

Índice de Figuras

Figura 1. a) Fullerenos y b) nanotubo de carbono de pared simple (CNT)	17
Figura 2. a) liposoma y b) micela.	18
Figura 3. a) nanopartícula de oro y b) Core-shell.	18
Figura 4. a) matriz de hidrogel embebida con nanofibras y b) nanotubo de carbono recubierto.	19
Figura 5. a) estructura molecular de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y b) ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).	32
Figura 6. Molécula de Geraniol, componente de esencias volátiles en las flores.	34
Figura 7. Estructura química de la antocianina, componente de pigmentos en flores.	35
Figura 8. Estructura de nicotina, componente adictivo del tabaco.	36
Figura 9. Esquema gráfico para síntesis de nanopartículas por método sol-gel.	43
Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO_2 (figura a) y Ag-TiO_2 (figura b) sintetizadas por metodología sol-gel.	49

Figura 11. Patrón de difracción de rayos X para nanopartículas sintetizadas mediante técnica sol-gel. 50

Figura 12. Espectro Raman de las nanopartículas TiO₂ y Ag-TiO₂ sintetizados mediante técnica sol-gel. 51

Figura 13. a) peso fresco de germinados de alfalfa tratados con TiO₂, b) peso fresco de germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO₂. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$). 53

Figura 14. a) Longitud de radícula de alfalfa tratados con TiO₂, b) Longitud de radícula de germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO₂. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$). 55

Figura 15. Efecto de NPs de TiO₂ (figura a) y Ag-TiO₂ (figura b) sobre unidades SPAD correspondientes con la pigmentación de hojas verdaderas en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$). 58

Figura 16. Efecto de NPs de TiO₂ (figura a) y Ag-TiO₂ (figura b) sobre sobre el ancho de hojas verdaderas en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$). 61

Figura 17. Efecto de NPs de TiO₂ (figura a) y Ag-TiO₂ (figura b) sobre sobre la longitud de hojas verdaderas en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias

significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$).
 63

Figura 18. Curva de calibración para Fenoles. 66

Figura 19. Curva de calibración para Flavonoides. 67

Figura 20. Curva de calibración para ABTS. 68

Figura 21 Curva de calibración para DPPH. 69

Figura 22 Efecto de NPs de TiO_2 (figura a) y de Ag-TiO_2 (figura b) sobre fenoles totales en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$). 70

Figura 23. Efecto de NPs de TiO_2 (figura a) y de Ag-TiO_2 (figura b) sobre flavonoides totales en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$). 71

Índice de Tablas

Tabla 1. Tamaños de nanopartículas calculados a partir de métodos Williamson-Hall y Scherrer, grado de cristalinidad y constante de estrés. 50

Tabla 2. Modificaciones del peso fresco en germinados de alfalfa. 53

Tabla 3. Modificaciones de longitud radicular en germinados de alfalfa. 56

Tabla 4. Modificaciones en los valores SPAD, correspondientes al cambio de pigmentación en hojas verdaderas de germinados de alfalfa. 59

Tabla 5. Modificaciones en el ancho de hojas verdaderas en los germinados de alfalfa. 62

Tabla 6. Modificaciones en la longitud de hojas verdaderas de los germinados de alfalfa.
 64

Tabla 7. Curva estándar para determinación de fenoles totales. 66

Tabla 8. Curva estándar para determinación de flavonoides totales. 67

Tabla 9. Estándar de calibración para determinación de actividad antioxidante mediante inhibición de radical ABTS ^{•+}	68
Tabla 10. Estándar de calibración para determinación de actividad antioxidante mediante inhibición de radical DPPH ^{•+}	69
Tabla 11. Actividad estabilizadora de radical DPPH ^{•+} en germinados de alfalfa tratados con TiO ₂	72
Tabla 12. Actividad estabilizadora de radical DPPH ^{•+} en germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO ₂	73
Tabla 13. Actividad estabilizadora de radical ABTS ^{•+} en germinados de alfalfa tratados con TiO ₂	74
Tabla 14. Actividad estabilizadora de radical ABTS ^{•+} en germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO ₂	76
Tabla 15. Actividad enzimática en germinados tratados con NPs de TiO ₂ y Ag- TiO ₂	78

1. INTRODUCCIÓN.

Durante los últimos años, la nanotecnología ha ganado gran relevancia en aplicaciones como salud pública, medicina, industria y agricultura. Este, es un amplio campo de estudio encargado de comprensión y manipulación de las propiedades físicas y químicas a nivel atómico, molecular o supramolecular, de la materia, con la finalidad de encontrar o mejorar propiedades que puedan ser aplicadas en la innovación de productos en distintos rubros como los antes mencionados (Sanzari et al., 2019).

En este sentido, el uso de nanometales como estimulantes en el crecimiento de plantas ha cobrado interés ya que tienen la propiedad de interactuar con estructuras vegetales debido a su tamaño y son capaces de internalizarse en la membrana celular. No obstante, los mecanismos de interacción no son del todo claros entre nanomateriales y plantas. Existen discrepancias y a menudo contradicciones sobre la absorción, translocación, acumulación, biotransformación y toxicidad de las nanopartículas en diversas especies vegetales. Por lo que aún quedan muchas interrogantes sobre el destino y las interacciones de las nanopartículas en las células vegetales (Ma et al., 2010). De esta forma, la absorción de nanopartículas por las plantas comprende un área poco predecible, pues depende de múltiples factores relacionados con la nanopartícula en sí (tamaño, composición química, carga neta y funcionalización de la superficie), pero también de las vías de aplicación, las interacciones con los componentes ambientales (textura del suelo, disponibilidad de agua, microbiota), la limitación debida a la presencia de una pared celular, la fisiología y la anatomía polifacética de cada especie vegetal (Sanzari et al., 2019).

Algunas de las nanopartículas metálicas y de óxido metálico que son más utilizadas en la industria son el dióxido de titanio (TiO_2), plata, óxido de zinc, dióxido de cerio, cobre, óxido de cobre, aluminio, níquel, así como hierro y por tanto, las que más se estudian por su impacto en distintas plantas. Algunas nanopartículas no metálicas,

como los nanotubos de carbono de pared simple y el fullereno, se han estudiado a fondo para revelar sus mecanismos de nanotoxicidad. Varios estudios sobre el impacto de las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos en las plantas han puesto de manifiesto sus efectos tóxicos, mientras que unos pocos estudios también han indicado su papel beneficioso en forma de mejora de los parámetros de crecimiento y productividad de las plantas (Cvjetko et al., 2017; Okupnik & Pflugmacher, 2016; Tripathi et al., 2017).

De este modo, la nanotoxicología se encuentra dentro de un aspecto de la "nanociencia", definido por la Royal Society como "el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, cuyas propiedades difieren significativamente de las de una escala mayor". Para entender la toxicidad de los nanomateriales, es preciso considerar su caracterización fisicoquímica en relación con una serie de factores, además de su composición y propiedades químicas. La nanotoxicología surge como una subdisciplina y con un considerable crecimiento en la ciencia toxicológica (Hobson & Guy, 2024).

El conocimiento desarrollado en las dos últimas décadas en esta subdisciplina sobre la realización de estudios nanotoxicológicos fiables y reproducibles ha ido en aumento. En particular en las áreas de caracterización de dosis, administración de dosis por diversas vías y evaluación de datos nanotoxicológicos para incluir propiedades como la composición química, las dimensiones del nanomaterial, el área de superficie de contacto, así como otras propiedades exclusivas de las características químicas y físicas del nanomaterial (Hobson & Guy, 2024; Wang & Fan, 2014). Derivado de esta situación, surge la necesidad de realizar diversas investigaciones con la finalidad de conocer que efectos provocan las nanoestructuras en organismos vivos, en este caso en particular en células vegetales.

2. ANTECEDENTES.

En la actualidad existen diversos estudios acerca de los efectos que puede tener el uso de nanopartículas en las plantas; sin embargo, la relación entre los efectos positivos y negativos respecto a la especie en la que se evalúa el tratamiento difieren mucho. Esto quiere decir, que aún no se comprende de manera clara cuáles son los mecanismos de acción que tienen este tipo de aditivos en la germinación y el crecimiento de las plantas, incluso los resultados son distintos dependiendo de la etapa de crecimiento en la que sea aplicado el tratamiento (Pérez-de-Luque, 2017). Diversos estudios han demostrado que el uso de altas concentraciones de nanopartículas puede llegar a provocar efectos tóxicos en cultivos de tomate, trigo, pepino, maíz, alfalfa, lechuga, entre otros (Elamawi & El-Shafey, 2013; Paramo et al., 2020; Simonin et al., 2017).

Derivado de esta situación surge la inquietud de evaluar, los posibles efectos que pudiesen presentar las especies *Medicago sativa* L. en la etapa de germinación bajo un tratamiento de riego por inmersión. Algunas investigaciones sugieren que el tratamiento con nanopartículas de TiO_2 puede afectar, por ejemplo, el desarrollo de Maíz (*Zea mays*) causando disminución en la tasa de germinación, longitud de la raíz, longitud del brote y bioacumulación (Cox et al., 2017a). Sin embargo, otro estudio realizado sobre el proceso de germinación y crecimiento en alfalfa (*Medicago falcata* L.) con presencia de nanopartículas de óxido de hierro II (Fe_3O_4), mostraron tener efectos positivos en proporción de concentraciones elevadas, incrementando el número de hojas, la longitud de la raíz y brote, el peso y la masa total de la planta (Kokina et al., 2020).

Por otra parte, un estudio realizado en Amaranto (*Amaranthus retroflexus* L.) demostró tener efectos negativos, cuando las plantas fueron expuestas a un tratamiento foliar con nanopartículas de plata, cobre y óxido de zinc, causando necrosis en las hojas y disminución del contenido de clorofila, siendo el óxido de zinc el tratamiento con mayores efectos adversos en la planta (ARUNA et al., 2014). Por

otro lado, un estudio realizado sobre la misma especie, reportó que el uso de nanopartículas de óxido de silicio (SiO_2) en concentraciones de 400, 2000 y 4000 mg/l, redujo drásticamente el porcentaje de germinación y longitud de brote y raíz; así como el peso fresco y seco en el brote y raíz. Así mismo se evaluó el efecto que tuvo el uso de estas nanopartículas sobre compuestos fotosintéticos como carotenoides y clorofila a, b y a+b. Los resultados demostraron tener un efecto negativo sobre la especie *Amaranthus retroflexus* L., ya que todos los compuestos mencionados, tuvieron un marcado descenso a medida que la concentración aumentaba (Sharifi-Rad et al., 2016). En contraste, una investigación realizada sobre Trigo (*Triticum aestivum* L.) evaluando el efecto de nanopartículas de TiO_2 , demostró tener efectos positivos en bajas concentraciones sobre la longitud de la raíz, germinación y producción de clorofila (Rafique et al., 2018).

Por lo mencionado anteriormente, es de interés estudiar el posible efecto que pudiese tener el uso de nanopartículas de TiO_2 dopadas y de TiO_2 dopadas con plata (Ag) como aditivos, en germinados de alfalfa (*Medicago sativa* L.) debido a su alto valor nutricional y su uso generalizado como alimento de forraje ya que representan un nicho de oportunidad de mejoramiento en la producción de dichas especies. Los germinados tienen gran importancia por su buen balance dietético, composición química y contenido de vitaminas; algunas especies como la alfalfa proporcionan a los consumidores mecanismos de defensa de manera natural (Barrón-Yáñez et al., 2009a).

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 Nanopartículas.

Las nanopartículas son partículas extremadamente pequeñas, con un tamaño comprendido de entre 1 y 100 nanómetros. Estas partículas poseen propiedades únicas debido a su tamaño y composición, lo que las hace útiles en una amplia variedad de aplicaciones. Existen varios tipos de nanopartículas, las cuales incluyen

nanopartículas metálicas, óxido-metálicas, de carbono y naturaleza poliméricas. Cada tipo de nanopartícula tiene propiedades únicas que las hacen ideales para diferentes aplicaciones (Jeevanandam et al., 2018).

Las nanopartículas tienen una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo la medicina, la electrónica, la energía y la industria alimentaria. En la medicina, las nanopartículas se utilizan en la administración de medicamentos, terapia de imagen e ingeniería de tejidos. En la electrónica, se utilizan en la fabricación de dispositivos electrónicos avanzados, como pantallas de alta resolución y dispositivos de almacenamiento de datos. En el ámbito energético, las nanopartículas se utilizan en la fabricación de baterías y celdas solares. En la industria alimentaria, han sido utilizadas como aditivos para mejorar la textura y el sabor de los alimentos, así como en empaques (Belay et al., 2023; Bhushan, 2017).

Una de las formas en la que nanopartículas se clasifican es por dimensiones, esta depende del movimiento de los electrones a lo largo del material. Por ejemplo los electrones que se encuentra en un nanomaterial 0D, no poseen una gran capacidad de movimiento, por lo que están “atrapados”, los materiales 1D poseen electrones que pueden moverse en un solo eje x inferior a los 100 nm, un ejemplo de estas son películas delgadas o monocapa; los 2D tienen movimiento de electrones a lo largo de los ejes x-y, como los nanotubos de carbono, nanohilos y nanopelículas, mientras que los 3D tiene un movimiento permitido en los ejes x-y-z, como dendrímeros, fullerenos y core-shell (Jeevanandam et al., 2018; Oprică & Bălăşoiu, 2019).

No obstante, las nanopartículas también pueden ser clasificadas de acuerdo a su tamaño, morfología y atributos químicos, cuando se hace en función de sus propiedades químicas y físicas los principales grupos son los siguientes:

3.2 Nanopartículas a base de carbono.

En general se puede hablar de dos grandes grupos de nanomateriales basados en carbono, los fullerenos y los nanotubos de carbono (CNT) (Figura 1). Son de especial interés gracias a su conductividad eléctrica, alta potencia, estructura,

afinidad electrónica y flexibilidad. Sus usos principales están enfocados como adsorbentes de gases activos para la remediación del medio ambiente, a la par de diversos catalizadores inorgánicos y orgánicos (“Carbon-Based Nanomaterials”, 2016).

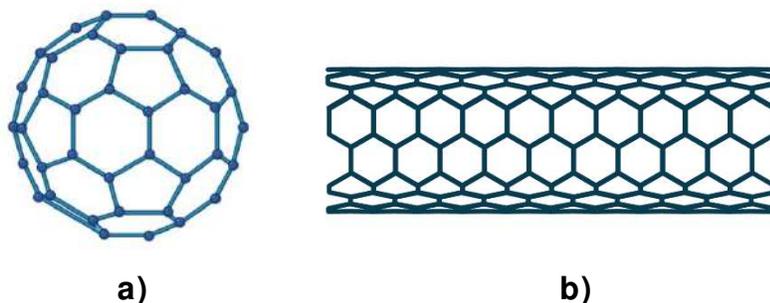


Figura. 1 a) Fullerenos y b) nanotubo de carbono de pared simple (CNT).

3.3 Nanomateriales orgánicos.

Las nanopartículas o polímeros orgánicos, tales como los dendrímeros, micelas, liposomas y ferritina, se encuentran reconocidas como nanomateriales de tipo orgánico (Figura 2). Estas diminutas partículas se caracterizan por ser biodegradables y no tóxicas, lo que las convierte en opciones seguras para diversas aplicaciones. Presentan un núcleo hueco, lo que las convierte en vehículos altamente versátiles y prometedoras en campos como la medicina y la farmacología (*Organic Nanomaterials*, s/f).

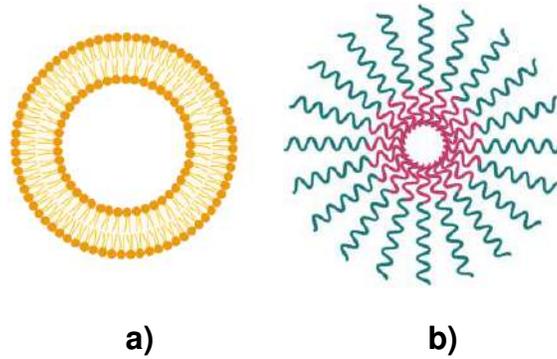


Figura. 2 a) liposoma y b) micela.

3.4 Nanomateriales inorgánicos.

Este tipo de partículas incluyen metales y óxidos metálicos. Por ejemplo, metales como Au o Ag (Figura 3), así como TiO_2 y ZnO además de semiconductores como silicio. Aprovechando estas características, este tipo de nanopartículas metálicas, óxidos metálicos y semiconductores están encontrando aplicaciones en muchos campos de investigación debido a sus avanzadas propiedades ópticas; incluyendo fotocatalisis, foto-óptica y dispositivos electrónicos, no obstante algunas de estas también han despertado interés en el campo agrícola como elicitores de crecimiento (Oprică & Bălăşoiu, 2019).

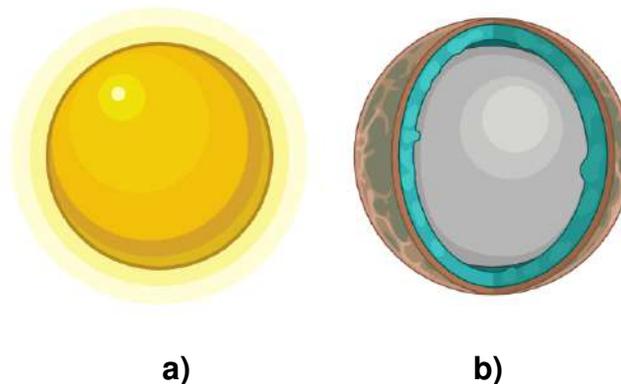


Figura. 3 a) nanopartícula de oro y b) Core-shell.

3.5 Nanomateriales compuestos o compósitos.

Los nanomateriales compuestos se caracterizan por poseer en su estructura dos o más componentes a escala nanométrica; sin embargo, estos pueden estar compuestos también de materiales de tamaño superior (por ejemplo, nanofibras híbridas, Figura 4). Los compósitos pueden ser combinaciones de nanomateriales a base de carbono, metal u orgánicos con cualquier forma de materiales a granel metálicos, cerámicos o poliméricos. Estos tienen propiedades únicas que no se encuentran en los materiales a granel debido a su tamaño y composición (Martínez et al., 2021; Vydiam & Mukherjee, 2023).

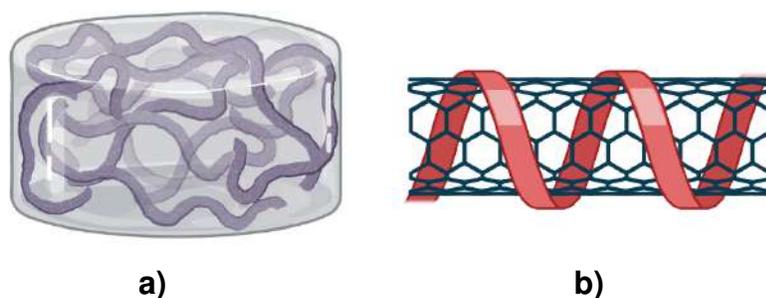


Figura. 4 a) matriz de hidrogel embebida con nanofibras y b) nanotubo de carbono recubierto.

3.6 Óxidos semiconductores

Los óxidos metálicos semiconductores, han ganado gran relevancia, gracias a la amplia gama de aplicaciones que se le atribuyen, entre las que destacan las ópticas-eléctricas, catálisis, sensores y remediación ambiental, esto debido al aprovechamiento de su capacidad de producir electrones libres a través de un fenómeno llamado “fotocatálisis”. En este sentido, los fotocatalizadores aprovechan la absorción de luz para producir transformaciones químicas de los participantes en la reacción y regenerar su composición química después de cada ciclo de dichas interacciones. Debido a una estructura electrónica conveniente, capacidad de absorción de luz, transporte de carga, así como el tiempo de vida de excitación de

los óxidos metálicos, ha hecho posible su aplicación como fotocatalizadores.

Óxidos metálicos como los óxidos de vanadio, cromo, titanio, zinc, estaño y cerio que tienen estas características siguen procesos fotocatalíticos primarios similares, como la absorción de luz, que induce un proceso de separación de cargas con la formación de huecos positivos capaces de oxidar sustratos orgánicos. En este proceso, un óxido metálico se activa cuando es expuesto ya sea a luz ultravioleta, luz visible o la combinación de ambos espectros. Cuando esto ocurre; los electrones excitados son promovidos desde la banda de valencia a la banda de conducción, formando un par electrón-hueco (e^-/h^+) siendo este capaz de reducir u oxidar un compuesto adsorbido en la superficie del agente fotocatalítico (Guo et al., 2019; He, 2020; M. M. Khan et al., 2015).

La actividad fotocatalítica del óxido metálico proviene de dos fuentes: la primera es la generación de $\cdot\text{OH}$ por oxidación de ion OH^- , el segundo de ellos se le atribuye a la generación del radical $\text{O}_2\cdot^-$ mediante reducción de O_2 . No obstante la capacidad que posee un óxido metálico semiconductor de promover pares electrón/hueco, está relacionada con la distancia que existe entre la banda de conducción (BC) y la banda de valencia (BV) y la energía con la que un fotón incide en la BV. Dicha distancia recibe el nombre de ancho de banda prohibida o banda prohibida, que en algunos casos es posible reducir gracias a un proceso conocido como “dopado”; el cual consiste en la adición de impurezas a la red cristalina. Existen dos tipos de dopaje: (I) dopado por cationes y (II) dopado por aniones. Cada tipo de dopante genera un impacto característico sobre la red cristalina del agente fotocatalítico. El dopaje de iones metálicos o por cationes (Ag, Al, Cu, Fe, Ni) y no metálicos o aniones (N, S, C, F) en la superficie de un fotocatalizador, aumenta su respuesta a la región visible mediante la creación de nuevos niveles de energía (o estado de impureza) entre BV y el BC para reducir su ancho de banda. Los electrones excitados por la luz se desplazan del estado de impureza a la BC (Ameta, 2016; He, 2020).

Entre los diversos fotocatalizadores, el TiO_2 , es el fotocatalizador más empleado, ya que se ha utilizado con creces en la fotocatalisis heterogénea, debido a su

estabilidad química, baja toxicidad y bajo coste. Existe en tres fases cristalinas con valores distintos de banda prohibida, anatasa (3.1 eV), rutilo (3.2 eV) y brokita (3.3 eV); resultando con mejores características fotocatalíticas la anatasa (Guo et al., 2019).

3.6.1 Óxidos semiconductores como agentes promotores de crecimiento en germinados

La fotosíntesis es un proceso que ocurre naturalmente mediante la irradiación de energía solar en organismos autótrofos, con la finalidad de producir carbohidratos, tomando su materia prima del agua y el dióxido de carbono (CO₂), mismos que se encuentran disponibles en toda la superficie terrestre (Rodríguez-González et al., 2019). Este proceso químico es crucial en el ciclo metabólico de las plantas y en consecuencia de la agricultura. Por su parte, también supone un proceso importante en la cadena alimenticia ya que, así como las plantas requieren de ciertas características y recursos para obtener su alimento, de la misma manera, los seres humanos requerimos obtener energía que nos ayude a realizar nuestras actividades diarias y nos proporcione los elementos para mantener en funcionamiento el cuerpo. De esta forma se vuelve de suma importancia el desarrollo de nuevas tecnologías que nos brinden una mejor producción de insumos vegetales de manera segura y con los menores efectos negativos posibles (Rodríguez-González et al., 2019).

En consecuencia, las nanopartículas basadas en materiales fotoactivos, surgen como una alternativa viable y de bajo costo ecológico para solucionar este problema, haciendo uso de una técnica conocida como "*seed priming*", la cual ha sido utilizada ampliamente en distintas especies, con el objetivo de generar una mejor germinación, alta producción, así como incrementar la calidad de producción de las semillas (Ahmed et al., 2021). El "*seed priming*" se puede llevar a cabo a través de distintos estímulos, como la cantidad de agua y sales inorgánicas para lograr una producción de alto vigor de las plántulas a través del proceso de germinación

uniforme dentro de la semilla, sin emergencia radical. No obstante, este método presenta algunos inconvenientes ya que requiere grandes cantidades de agentes promotores, lo cual resulta en un problema de residuos contaminantes en el suelo y agua, así mismo, los potenciadores del crecimiento de las semillas convencionales no son estables, en comparación con las partículas de tamaño nanométrico. Debido a la falta de estabilidad y a la pérdida de grandes cantidades de residuos tóxicos, es necesario aplicar repetidamente estos potenciadores del crecimiento de las semillas. Por esta razón, las nanopartículas se proponen como agentes potenciadores de crecimiento eficientes sobre semillas en investigaciones recientes (Ea, 2016; Raj & Sheeja, 2019).

Algunos fertilizantes basados en TiO_2 (fase anatasa) ayudan a mejorar la absorción de luz y favorece la actividad de la enzima rubisco activasa la cual tiene dos funciones importantes en los organismos autótrofos, una de ellas es ayudar a la fijación de CO_2 y la otra es que actúa como un fotorrespirador. La anatasa induce el incremento de contenido del complejo II de captación de luz en las membranas de los tilacoides (Poddar et al., 2020); el conjunto de estas características ayuda enormemente en el crecimiento de la planta (Millán-Chiu et al., 2020). La anatasa también tiene la propiedad de incrementar los pesos frescos y secos en la planta, mediante la transformación de nitrógeno inorgánico en orgánico.

3.7 Agricultura

Actualmente, la agricultura ejerce fuertes efectos nocivos sobre el clima debido a su elevado consumo de energía y al consumismo humano. Los pesticidas para el control de plagas, así como los fertilizantes que contaminan las fuentes de agua favorecen la erosión del suelo. Estas acciones representan los principales factores causantes de la contaminación agrícola y medioambiental. La nanotecnología es un enfoque emergente que puede ayudar a superar estos problemas y conducir a una agricultura sostenible (“ACS Select on Nanotechnology in Food and Agriculture”, 2014; *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027 | OECD-FAO Agricultural Outlook | OECD iLibrary*, s/f; Borsato et al., 2018).

En este sentido, el uso de nanotecnología en aplicaciones agrícolas ha ido en ascenso en los últimos años como una alternativa, “China representa uno de los países más avanzados en cuanto al desarrollo de nanotecnología; cuenta con 28 patentes entre el 2011 y el 2015 “ (Paramo et al., 2020). La aplicación de la nanotecnología en la agricultura minimiza el costo de los fertilizantes y los plaguicidas mediante el avance de esta herramienta. Los principales campos de aplicación dentro de la agricultura han sido el empaquetado de alimentos, la aplicación de nanofertilizantes, nanofungicidas y nanoherbicidas con el objetivo de tener una mejora en el producto final, evitar enfermedades, plagas, ayudar al desarrollo y crecimiento de la planta. El objetivo principal es generar un estrés específico sobre la planta para tener efectos deseados sobre la producción de sustancias promotoras de desarrollo y crecimiento en la planta.

Distintas investigaciones se han enfocado en estudiar los efectos que tienen los nanomateriales en el proceso de germinación y crecimiento en distintas especies de plantas, como maíz, pepino, arroz, trigo, tomate, lechuga, espinaca y otras más. Esto con el objetivo de promover su uso en aplicaciones agrícolas y mejorar la eficiencia en la producción. Por ejemplo, se ha reportado el uso de nanopartículas de (óxido de titanio) TiO_2 en el tratamiento de semillas de espinaca, produciendo 73% más de peso seco, tres veces más actividad fotosintética y un incremento en la producción de 45% de clorofila a, en comparación con el grupo control (Khot et al., 2012).

3.7.1 Nanofertilizantes.

Un fertilizante es una sustancia química que proporciona elementos nutritivos para las plantas. Como producto químico, es una sal inerte sin carga que, al mezclarse con el agua, ya sea del suelo o de una solución, se disocia y deja nutrientes en forma iónica, es decir, elementos con carga negativa (aniones) o con carga positiva (cationes) (Guzmán & Diaz, 2004). Los fertilizantes pueden ser diseñados de dos maneras, una de ellas es a nanoescala y la otra es como un conjugado basado en nanotransportadores. En el primer caso, macronutrientes y micronutrientes son

sintetizados a nanoescala para actuar directamente como fertilizantes, en el segundo caso hablamos de nanomateriales que son acoplados a fertilizantes tradicionales, es decir, que las nanoestructuras son tratadas como aditivos. El uso en general de nanoestructuras ya sea como fertilizantes o como aditivos ofrecen múltiples beneficios, como la liberación controlada de las sustancias activas en función de las necesidades que requiera la planta durante el crecimiento y desarrollo (Pitambará et al., 2019).

Estudios recientes indican que los nanofertilizantes tienden a mejorar el rendimiento del cultivo, la fertilidad del suelo y el vigor total de la planta, sugiriendo que la aplicación nanotecnológica de estos, tiene efectos benéficos sobre la germinación de las semillas y crecimiento de raíces y hojas en experimento realizados (Ashfaq et al., 2017).

En esencia el papel principal que juegan los nanofertilizantes es el de propiciar una liberación controlada y dirigida de nutrientes que ayuden a aumentar la eficacia en el desarrollo de la planta, generando así una mayor viabilidad económica. Por mencionar algunos tipos de aditivos que se han producido se tienen la zeolita, cobre, sílice, aluminio, carbón, zinc y nitrógeno (Silva et al., 2018).

3.7.2 Efectos de Nanofertilizantes.

La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo apuntan a que el uso de nanofertilizantes en plantas sugiere efectos positivos, sin embargo, no siempre es de esta manera. Una investigación realizada en *Microstegium vimineum*, usando nanopartículas de plata; reporta efectos adversos como lento crecimiento, incremento en el estrés oxidativo, anomalías genéticas, por mencionar algunas (Colman et al., 2013). En un caso similar, otro estudio realizado sobre *Pennisetum glaucum* con el mismo tipo de partícula, demostró tener efectos positivos en la etapa de germinación, pero después afectó el crecimiento de la plántula (Parveen & Rao, 2015). Es evidente que existen respuestas contradictorias (que están asociadas a altas o bajas concentraciones empleadas) en cuanto a cuál es el efecto que las

nanopartículas tienen sobre la planta, no existe un indicativo específico de la respuesta toxicológica en una especie en particular tampoco la naturaleza de partícula, carga superficial, morfología o tipo de exposición, que afectarán de una manera en particular al organismo; existen diversas variables a considerar, no obstante, existe una correlación de efectos adversos y altas concentraciones de materiales nanoparticulados. Es importante remarcar que este comportamiento no se presenta en todas las especies (Basahi, 2021; Ittroutwar et al., 2020; Szöllösi et al., 2020).

3.8 Estrés biótico y abiótico

Las plantas se desarrollan y reproducen en entornos difíciles, llenos de numerosos elementos químicos y físicos que cambian con el tiempo y el lugar. La luz, el agua, el dióxido de carbono, el oxígeno, la disponibilidad y el contenido de nutrientes del suelo, la temperatura, las sales y los metales pesados son los principales factores ambientales abióticos que influyen en el crecimiento de las plantas. Estas fluctuaciones de los componentes abióticos suelen tener efectos perjudiciales sobre la bioquímica y la fisiología de las plantas. Sin embargo, la planta no solo se encuentra expuesta a agentes abióticos, sino que también está en constante interacción con agentes biológicos, es decir, un estrés biótico. Los seres vivos, en particular virus, bacterias, hongos, nematodos, insectos, arácnidos y malas hierbas, son los principales responsables del desarrollo del estrés biótico en las plantas. La muerte de las plantas puede deberse a que los agentes de estrés biótico privan directamente a su huésped de sus nutrientes. Al permanecer en un estado estático, las plantas no pueden simplemente trasladarse a un hábitat más favorable para escapar del estrés. Por lo que para superar estas limitantes, han desarrollado la capacidad de adaptarse a condiciones adversas, cambiando entre procesos fisiológicos y bioquímicos para mantener el crecimiento y la reproducción (*Abiotic and Biotic Stress*, 2020; *How Abiotic Stress Conditions Affects Plant Roots*, 2020).

3.8.1 Nanopartículas como generadores de estrés.

Dentro de los estímulos estresores abióticos se encuentran los distintos tipos de nanopartículas y su reciente uso como agentes elicitors. Un agente elicitor es un factor de estrés que tiene la capacidad de inducir en las plantas características estimulantes como el aumento del crecimiento, el rendimiento, la calidad de la producción (bioestimulación) así como un incremento en la tolerancia al estrés (elicitación) (Godínez-Mendoza et al., 2023), en este caso con el propósito de mejorar el proceso germinativo. No obstante, el uso de nanoestructuras ha demostrado tener efectos variados en cada una de las especies evaluadas. Los efectos observados dependen en general de sus propiedades como son: naturaleza física, métodos de preparación, tamaños, estructuras de las nanopartículas y el modelo biológico sobre el que se realizan las pruebas. Los principales indicadores fisiológicos de los efectos tóxicos de las NPs son la energía germinativa, la elongación de las raíces y la biomasa de las hojas, entre otros. Al mismo tiempo existe evidencia (Mushinskiy & Aminova, 2019; Santás-Miguel et al., 2023) que indica que algunas NPs pueden tener importantes consecuencias negativas como la reducción de la germinación de las semillas e inhibición de la brotación y de la longitud de las raíces. Por lo tanto, el efecto observado por el uso de los distintos materiales nanoparticulados no indica una clara tendencia en cuanto a si las consecuencias de uso son positivas o negativas.

El dióxido de Titanio (TiO_2) es uno de los compuestos nanoparticulados más utilizados como agentes elicitors de crecimiento debido a su amplia disponibilidad; ha demostrado tener efectos positivos sobre el crecimiento de plantas (Iqbal et al., 2021; Kushwah & Patel, 2020; Ranjan et al., 2021). Por otro lado los efectos observados usando nanopartículas de Zn sobre la germinación indican una dependencia de la concentración de nanopartículas de Zn, mostrando un efecto nulo o positivo a bajas concentraciones y un efecto inhibitor a concentraciones más altas de estas nanopartículas, en algunos casos favorecieron el proceso en algunas plantas como frijol, *Capsium annuum*, *T. aestivum* y *Linum usitatissimum* (Bayat et al., 2022; García-López et al., 2018a; Nguyen et al., 2021).

Algunos otros tipos de nanopartículas son usados para aliviar la latencia de las semillas y promover la germinación así como el vigor germinativo de especies

agrícolas y forestales; esto a través de procesos de acumulación de las nanopartículas en la cubierta de la semilla, lo cual puede mejorar la focalización de especies reactivas del oxígeno y, por lo tanto, activar los procesos bioquímicos implicados en la ruptura de la latencia de la semilla y activar la germinación de la semilla (I. Khan et al., 2022).

3.8.2 Estrés abiótico generado por metales.

El estrés generado por metales pesados es uno de los principales promotores de estrés abiótico que provoca efectos peligrosos en los seres vivos, incluidas las plantas. En general los metales pesados son no biodegradables, lo que significa que no pueden ser eliminados por medio natural en el contexto ambiental. Algunos son considerados inmóviles, es decir, no pueden trasladarse de la zona en la que inicialmente son acumulados, mientras que otros denominados móviles si pueden ser absorbidos por el sistema radicular de las plantas mediante difusión (Varma & Jangra, 2021). Los metales pesados, pueden encontrarse en distintas cantidades en el ecosistema afectando directamente al crecimiento y la fisiología de las plantas. Las plantas superiores extraen iones metálicos biológicamente utilizables de la solución del suelo a través de transportadores de membrana, y diferentes cationes metálicos son transportados a través de la membrana plasmática en las raíces.

El mecanismo molecular de respuesta de las plantas al estrés abiótico es multinivel y multiproceso, e implica detección, transducción de señales, transcripción, procesamiento y traducción y modificación de proteínas, es un mecanismo de respuesta complejo con múltiples genes, vías de señalización así como procesos metabólicos (Dong et al., 2022; Zhang et al., 2023). Por ejemplo a altas concentraciones de metales pesados como: Cd, Ni, Pb, Cu y Zn en áreas de producción vegetal se induce estrés en la planta, la aparición de estímulos abióticos, ya sea de forma individual o simultánea, desencadena la sobreproducción de ROS en las células vegetales, lo que se convierte en un reto importante para el crecimiento y la productividad óptimos de las plantas (Sachdev et al., 2021). Una vez promovida la formación de radicales libres en la planta bajo estrés, se

manifiestan daños en los tejidos y puede conducir a deterioro oxidativo (Foyer et al., 1997; *How Abiotic Stress Conditions Affects Plant Roots*, 2020).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) representan un papel fundamental en el proceso de adaptación de las plantas al estrés abiótico. Principalmente funcionan como moléculas de transducción de señales que regulan diferentes vías durante la adaptación de las plantas al estrés, sin embargo, también son subproductos tóxicos del metabolismo del estrés. Así mismo las plantas manifiestan el estrés a través de la producción de metabolitos secundarios, los cuales funcionan como moléculas señalizadoras. No obstante, la producción de ROS y metabolitos secundarios no son los únicos mecanismos con los que cuenta las plantas para combatir el estrés inducido por estímulos bióticos y abióticos; también entran en juego la activación de distintas enzimas, que en general representan la primera línea de defensa ante escenarios adversos; todos estos sistemas funcionan en conjunto para proveer al organismo protección ante el estrés.

3.9 Especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species: ROS por sus siglas en inglés) son moléculas químicamente activas que contienen oxígeno y que pueden oxidar otras moléculas, es decir, atraer o robar electrones libres de otras moléculas cercanas reduciendo así su número de oxidación y volviéndose “estables”. Las ROS incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, tanto inorgánicos como orgánicos, las especies reactivas de oxígeno son participantes esenciales en la señalización celular, la inducción de la respuesta mitogénica y la defensa contra agentes infecciosos. El exceso de los ROS puede alterar la función celular normal y promover el daño irreversible a lípidos, ácidos nucleicos y a proteínas celulares (Carvajal Carvajal, 2019). En las células vegetales las ROS son generadas en diferentes organelos, principalmente en el cloroplasto y peroxisomas, sin embargo también en la mitocondria, membrana plasmática, pared celular, retículo endoplasmático y el núcleo (Das & Roychoudhury, 2014; Karpinska et al.,

2017). Se les considera como metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos. Los ROS incluyen especies radicales y no radicales. Algunos de ellos son el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot OH$), Radical alcóxido (RO^{\cdot}), Radical peroxilo (ROO^{\cdot}), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Oxígeno singulete (1O_2) y Ozono (O_3), entre otros. Las ROS, según su nombre lo indica, presentan una reactividad más alta que el oxígeno molecular. Algunas de ellas pueden ser radicales libres, es decir, moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos períodos de tiempo (Londoño Londoño, 2012; Valko et al., 2007).

Un radical puede donar un electrón desapareado a otra molécula o puede robar un electrón, para formar un par electrónico. Si un radical toma un electrón de otra molécula o dona uno, la otra molécula se transformará en un radical libre, por lo que se puede decir que esta es una de las características, más importantes de las ROS; son capaces de comenzar reacciones en cadena.

Es importante tener en cuenta que la producción de ROS es una consecuencia inevitable de la vida aeróbica y un aspecto negativo de las enormes ventajas energéticas que ofrece la utilización de O_2 respecto de los metabolismos fermentativos de los organismos anaeróbicos. Aún bajo condiciones óptimas de funcionamiento, no menos 3 de un 5% de los electrones transferidos durante la fotosíntesis y la respiración van a parar al O_2 y producen ROS (Carrillo & Valle, 2023).

Las diferentes especies reactivas pueden originar un estado conocido como estrés oxidativo. Este es definido convencionalmente como un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la defensa antioxidante, encargada de la remoción de dichas especies. En el estrés oxidativo el desbalance se da a favor de un aumento significativo en la concentración de las sustancias o especies oxidantes reactivas. En una situación donde este desbalance es muy pronunciado,

las moléculas biológicas como el ADN, las proteínas y los lípidos de la membrana pueden resultar dañados en forma irreversible (Das & Roychoudhury, 2014; Halliwell & Whiteman, 2004).

3.9.1 Actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se refiere a la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (ejemplo, peroxidación lipídica), por lo que un antioxidante desempeña un papel importante, debido a su capacidad para reaccionar con radicales libres, terminando reacciones que suceden en cadena. Es necesaria una distinción entre actividad estabilizadora de radicales libres o anti-radicalaria (*scavenger* en inglés) y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. Por su parte, la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad anti-radicalaria no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante; en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante (Londoño Londoño, 2012).

Los procesos de propagación en cadena pueden ser interrumpidos mediante reacciones entre agentes reductores y oxidantes. En un escenario general, los antioxidantes rompen la cadena, ralentizan o detienen los procesos oxidativos “apagando” los radicales portadores de la cadena. El papel que juegan los antioxidantes es frenar a los radicales libres para que no causen ningún daño al organismo. Los antioxidantes preventivos frenan las especies oxidantes antes de que se produzca el daño (Sundaram Sanjay & Shukla, 2021), la forma en que lo hacen es empleando antioxidantes de naturaleza enzimática para reducir o controlar la acción oxidante.

El segundo sistema son los antioxidantes secundarios también llamados “*chain*

breaking”, los cuales tienen la capacidad de capturar radicales libres para evitar que se inicien reacciones en cadena y el tercer mecanismo se trata de aquellos que son capaces de reparar biomoléculas dañadas a causa de radicales libres. De esta forma se puede hablar de al menos tres escenarios de acción que posee el organismo para combatir a los radicales libres; el primero de ellos se enfoca en prevenir la reacción inicial, el segundo intercepta radicales iniciadores de reacciones en cadena y el tercero actúa sobre aquellos compuestos que no pudieron ser estabilizados o “apagados” con las primeras dos medidas (Coba et al., 2010; Sun et al., 2018).

Las medidas antioxidantes directas, ocurren mediante mecanismos de acción distintos, como son las actividades de eliminación de ROS, HAT (Hydrogen Atom Transfer por sus siglas en inglés), SET (Single Electron Transfer por sus siglas en inglés), poder reductor, quelación de metales y prevención de la peroxidación lipídica, por mencionar algunos.

La base del mecanismo de acción clásico de los antioxidantes, indica que se puede transferir tanto un átomo de hidrógeno ($H\bullet$) o un electrón (e^-) como ambos para inhibir los pasos de iniciación o propagación de los radicales. De esta forma los ensayos no enzimáticos de ruptura de cadena se clasifican comúnmente como ensayos basados en HAT y SET para medir la actividad de barrido de ROS (Sun et al., 2018). Ambos mecanismos (HAT y SET) pueden ocurrir simultáneamente; no obstante, la reacción dominante en un sistema está determinada por la estructura de los antioxidantes y algunas características como solubilidad y coeficientes de partición, así como por el solvente del sistema (Shahidi & Zhong, 2015).

De manera general las metodologías basadas en los mecanismos HAT, miden la capacidad que poseen los antioxidantes para apagar radicales libres mediante la transferencia de hidrógenos, algunas pruebas representativas son la ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, por sus siglas en inglés) y TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter, por sus siglas en inglés). Por otro lado, los ensayos fundamentados en el mecanismo SET, detectan la capacidad que tiene un antioxidante potencial para transferir un electrón a un compuesto oxidado,

incluyendo metales, carbonilos y radicales; algunos ejemplos son FRAP (Ferric Reducing Antioxidante Power por sus siglas en inglés y CUPRAC (Copper Reduction Assay, por sus siglas en inglés). No obstante también existen técnicas que combinan ambos mecanismos como la TEAC o ABTS (Absorbance of 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (Figura 5a), por sus siglas en inglés) y DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidracilo, (Figura 5b)) (Mayoral et al., 2019; Sun et al., 2018; Sundaram Sanjay & Shukla, 2021).

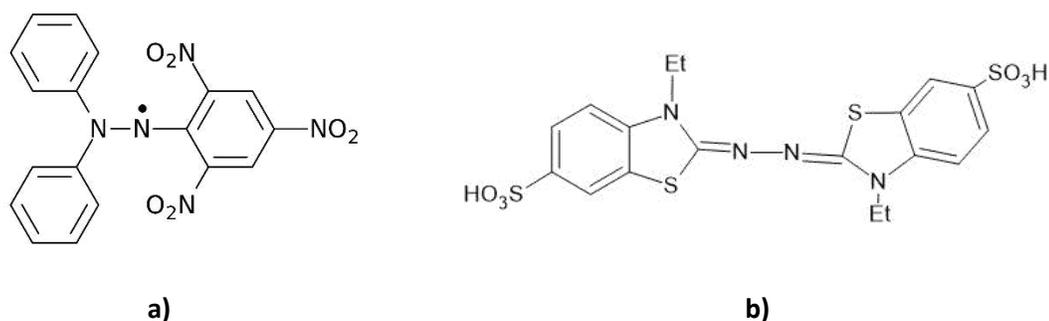


Figura. 5 a) estructura molecular de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y b) ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

3.10 Metabolitos secundarios.

El metabolismo comprende varios mecanismos de reacciones químicas que se llevan a cabo en las células de los seres vivos con la finalidad de sintetizar moléculas complejas a partir de otras más simples o para degradar estructuras complejas en unas más simples, un ejemplo de esto es la degradación de proteínas en aminoácidos y viceversa. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes necesarias para su funcionamiento y el de los organismos (Pérez-Urria Carril y Ávalos García, 2009). Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas que desempeñan funciones esenciales; este sistema es conocido como “metabolismo primario”. Así mismo plantas y organismos autótrofos, poseen un segundo mecanismo llamado “metabolismo secundario”. Estos son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario.

Los productos provenientes del metabolismo primario (aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos) participan directamente en el crecimiento y supervivencia de las plantas, pero los metabolitos secundarios (como fenoles, terpenos, alcaloides) actúan como mediadores (CyD, s/f). Estos compuestos químicos sintetizados por las plantas no son esenciales para su supervivencia, pero desempeñan un papel importante en la interacción de la célula u organismo con su entorno, además intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, a menudo están involucrados en la protección de las plantas contra el estrés biótico o abiótico. Mientras que los metabolitos primarios tienen funciones metabólicas esenciales para la nutrición y reproducción, por lo tanto, los metabolitos secundarios cumplen funciones no esenciales pero vitales en la adaptación y defensa de las plantas (Pagare et al., 2015; Pérez-Urria Carril y Ávalos García, 2009).

Otros ejemplos de metabolitos secundarios son los flavonoides, taninos, lignanos, saponinas, alcaloides, polifenoles y cumarinas. Estos compuestos pueden ser altamente inducibles en respuesta al estrés y desempeñan un papel importante en las defensas de las plantas contra animales e insectos. Los metabolitos secundarios anteriormente mencionados son clasificados en terpenoides (como la saponina), fenólicos (como las flavonas, la lignina, el tanino, los flavonoides y la gliceolina) y compuestos nitrogenados (como la sinigrina y la durrina) (Almaraz Abarca et al., 2006; “Secondary Plant Metabolites”, 2016; Teoh, 2015).

3.10.1 Terpenos.

Los terpenos (también llamados terpenoides) representan el mayor grupo químico diversificado de metabolitos secundarios, que contienen más de 22.000 compuestos, estos a su vez se dividen en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y politerpenos (Tiku, 2018). En las plantas, tienen funciones tanto ecológicas como fisiológicas relacionadas con hormonas, insecticidas, así como polinizadoras; juegan un papel importante en contra de bacterias, protozoarios y hongos. Un ejemplo de su función es la capsaicina y su efecto bactericida.

Normalmente actúan como molécula de defensa contra patógenos y herbívoros, reguladores del crecimiento de las plantas y compuestos que influyen (indirecta o directamente) en el desarrollo y crecimiento de las plantas vecinas. Por otra parte, los tetraterpenos como los carotenoides (pigmentos naranja, rojo y amarillo) funcionan como pigmento accesorio en la fotosíntesis, así como protección de tejido fotosintético de la foto-oxidación (Bartwal et al., 2013; *Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants*, s/f; Price et al., 1989; Shitan, 2016).

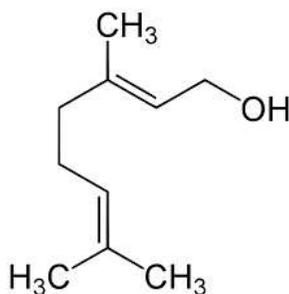


Figura 6. Molécula de Geraniol, componente de esencias volátiles en las flores.

3.10.2 Fenoles.

Son probablemente el mayor grupo de metabolitos secundarios, van desde compuestos simples con un único anillo aromático hasta compuestos complejos que son polímeros como los taninos y ligninas. Incluyen cumarinas, quinonas, naftoquinonas y antraquinonas, todos ellos flavonoides que dan olor, aroma y color a las plantas. Algunos de estos compuestos tienen efectos fisiológicos en los animales. La vainillina se utiliza mucho para aromatizar los alimentos (Teoh, 2015). Desde el punto de vista químico, los fenoles vegetales son sustancias heterogéneas, algunos solubles sólo en disolventes orgánicos, otros en agua y algunos polímeros que son insolubles. La luz ultravioleta puede activar algunos fenoles simples. Los fenoles son abundantes en las plantas vasculares y parecen tener diversos usos. Una de las principales familias de fenólicos vegetales son los flavonoides, que tienen una estructura básica de 15 carbonos organizados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos; por ejemplo la antocianina

(Figura 7) es la responsable de las tonalidades rojas, rosas, púrpuras y azules de las plantas (Lee, 2010; Nwokeji et al., 2016).

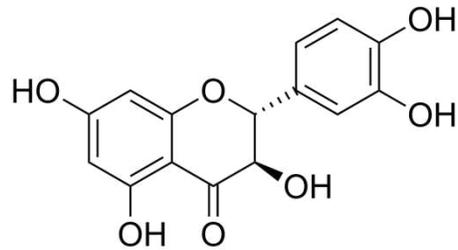


Figura. 7 Estructura química de la antocianina, componente de pigmentos en flores.

3.10.3 Alcaloides

El término "alcaloide" se utiliza para describir sustancias generadas a partir de plantas que tienen un efecto notable sobre los animales, incluido el ser humano. Estos compuestos suelen incluir uno o más átomos de nitrógeno en un anillo heterocíclico (un grupo funcional amina). Funcionan ópticamente. Están formados por aminoácidos, al igual que las proteínas, pero se diferencian en que son alcalinos (Al-Khayri et al., 2023; Teoh, 2015). Pueden ayudar a la germinación y proteger a las plantas de los depredadores, sobre todo herbívoros y bacterias, entre otras muchas funciones; el 20% de las plantas superiores en general los tienen. Así mismo pueden encontrarse ocasionalmente en animales, como en la piel de algunos tipos de ranas. Un gran número de alcaloides suelen acumularse en los tejidos vegetales sometidos a distintos tipos de estrés. El triptófano, la tirosina, el ácido aspártico y la lisina son ejemplos de aminoácidos comunes que pueden convertirse en alcaloides, por su parte los alcaloides más comunes son la cocaína, morfina, atropina, colchicina, quinina y nicotina (Figura 8). Por ejemplo, los alcaloides contenidos en la cafeína, presentes en el té, el cacao y el café, son venenosos para hongos e insectos. En las plantas de tabaco se encuentra la nicotina, que se transfiere de la raíz a las hojas de la planta y finalmente se almacena en las vacuolas de las hojas (Tiku, 2018).

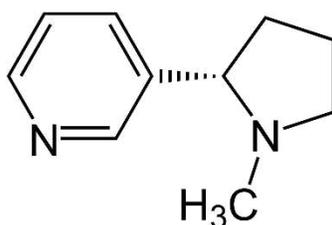


Figura. 8 Estructura de nicotina, componente adictivo del tabaco.

3.11 Germinados.

Los germinados representan un tipo de alimento que son consumidos cuando se encuentran en etapas de desarrollo; presentan características propias de una hortaliza; es un alimento rico en enzimas, aminoácidos y proteínas, clorofila, vitaminas, minerales y oligoelementos (Barrón-Yáñez et al., 2009b). Algunas especies de semillas durante la germinación aumentan en gran medida su peso, volumen y valor nutrimental.

En consecuencia, los germinados cobran relevancia debido al buen balance dietético, composición química y contenido de vitaminas, gracias a estas características se perfilan como un medio alimenticio barato que puede contribuir en gran medida a resolver problemas de desnutrición y corregir carencias de una alimentación basada en alimentos procesados (Gutiérrez, 1983).

La germinación de una semilla se define como un proceso que inicia con la absorción de agua por la semilla seca y concluye cuando una parte de esta atraviesa las estructuras envolventes que la rodean; durante este proceso se generan reacciones metabólicas, cambios estructurales y bioquímicos en la semilla para que se pueda dar la emergencia de la radícula (primer brote), lo cuales de suma importancia para el desarrollo de la planta (Matilla, 2008; Sanchez, 2018).

El proceso de la germinación se compone principalmente de tres etapas importantes. La primera es una fase de hidratación, posteriormente una de germinación y finalmente una de crecimiento. El proceso comienza con la absorción

de agua causando el hinchamiento de la semilla que va de la mano con un aumento en la actividad respiratoria. En segundo lugar, ocurre lo que se conoce como germinación o activación de metabolismo, lo cual desencadena una secuencia de cambios en la respiración, síntesis proteica y movilización de reservas energéticas a través de la degradación de componentes como almidón, lípidos y proteínas; finalmente tiene lugar la división y alargamiento celular en el embrión (semilla) provocando la ruptura de las cubiertas seminales lo que propicia la aparición de la radícula (Matilla, 2008; Rajjou et al., 2012; Shaban, 2013; Vázquez-Ramos y Sanchez, 2003; Weitbrecht et al., 2011).

La duración de cada fase o etapa de germinación depende de varios factores ambientales, abióticos y propios de la semilla como el contenido de compuestos hidratables, pH, temperatura, nutrientes disponibles, permeabilidad de la cubierta al agua y al oxígeno. La importancia de estos procesos es vital ya que sin germinación no hay plantas y en consecuencia no hay cosecha, la germinación permite facilitar el nacimiento precoz de diferentes plantas a cultivar, el máximo rendimiento de la semilla, así como la obtención de mejores y mayores cosechas evitando la eliminación de plantas por exceso. Es también importante lograr una mejor germinación para poder tener una adaptación más rápida por parte de la planta al medio en donde se desarrollará.

Sin lugar a dudas, una semilla de buena calidad representa una mayor probabilidad de éxito de germinación, contribuyendo significativamente a mejorar su producción en términos de calidad y rentabilidad (Al-Namazi et al., 2020; Han y Yang, 2015; Nalwa y Seth, 2021). Por tal motivo, son de gran interés las investigaciones encaminadas a estimular y mejorar la germinación, para poder elevar la productividad de los cultivos de forma sostenible (Doria, 2010).

4. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.

Existen diversos datos acerca del efecto que tienen los óxidos semiconductores sobre el crecimiento y desarrollo de plantas. El objetivo principal de los aditivos, es el de imprimir un efecto positivo en la germinación y en la primera etapa de crecimiento de las plantas. Por esta razón, se han propuesto agentes elicitores, como fertilizantes con nanopartículas, nanofertilizantes, agentes impresores incluso se ha propuesto el uso de las nanopartículas como promotores de crecimiento; no obstante, la información acerca de los efectos que se tienen en los procesos germinativos se encuentra en etapas iniciales, por lo cual no se cuenta con el suficiente conocimiento para asegurar si un tipo particular de nanopartícula afectará positiva o negativamente el desarrollo de la germinación y crecimiento de la planta. Por lo tanto, es de interés estudiar el efecto que tienen materiales semiconductores como el TiO_2 sobre la germinación y crecimiento de alfalfa.

5. PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

5.1 Hipótesis

El uso de nanopartículas de TiO_2 y TiO_2 dopadas con Ag (Ag-TiO_2), sobre semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L) mediante el método de inmersión; podría generar cambios morfológicos como aumento en la longitud del brote, el número de hojas y el peso fresco. En el perfil metabólico y antioxidante se esperaría tener un incremento en la actividad de los metabolitos secundarios como los flavonoides y fenoles, así como un aumento en la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Finalmente, se espera evaluar estos efectos en la etapa de germinación y el impacto que tendrá sobre la misma.

5.2 Objetivo general

Identificar el efecto fisiológico y metabólico de nanopartículas de óxidos

semiconductores de TiO_2 y TiO_2 dopadas con Ag, sobre el proceso germinativo de alfalfa.

5.3. Objetivos específicos

1. Síntesis de nanopartículas (NPs) TiO_2 y TiO_2 dopadas con Ag (Ag-TiO_2), mediante la técnica de sol-gel.
2. Caracterizar la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM), estructura cristalina a través de difracción de rayos X (XRD) y espectroscopía Raman de las Nanopartículas (NPs) de TiO_2 y TiO_2 dopadas con Ag.
3. Estandarización de metodología “entre papel” para el proceso germinativo.
4. Analizar los cambios físicos que presenten los germinados cuando son sometidos a un proceso de hidratación por inmersión en soluciones ricas en nanopartículas de TiO_2 y TiO_2 dopadas con Ag, evaluando parámetros de crecimiento como morfología del germinado: Tamaño de hojas, longitud de radícula, peso fresco, etc.
5. Cuantificar concentraciones de metabolitos secundarios (flavonoides y fenoles totales), actividad enzimática (fenilalanina amonio liasa, tirosina amonio liasa y superóxido dismutasa) y capacidad antioxidante con 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), en extractos de germinado de alfalfa sometidos a la presencia de nanopartículas de TiO_2 y TiO_2 dopadas con Ag.

5.4 Justificación.

En años recientes, el uso de la nanotecnología en distintas aplicaciones tecnológicas como agricultura y empacado de alimentos; salud y medicina, entre otras, ha atraído la atención de varios investigadores por la versatilidad de aplicaciones que prometen este tipo de tecnología nanoparticulada. En el área alimenticia, los nanometales tienen la capacidad de estimular el crecimiento de plantas en distintas etapas, promoviendo la activación del proceso metabólico. Debido al tamaño de partícula, estos materiales (NM) son capaces de penetrar en

la membrana celular y provocar cambios de distintas naturalezas en un organismo, como son cambios morfológicos, metabólicos, enzimáticos e incluso, alteraciones de ADN y ARN, lo que tiene repercusiones importantes en el mismo desarrollo. No obstante, tales repercusiones pueden variar y en ocasiones resultar contraproducentes en el crecimiento de las plantas, ya que, pueden llegar a alentar o incluso a inhibir el crecimiento de las mismas.

Sin embargo, dichas interacciones entre NPs y plantas no son ampliamente entendidas por lo que representan un área de oportunidad. Aunado a esto, existe un interés por desarrollar nuevas formas para promover el crecimiento de cultivos de naturaleza alimenticia (Maíz, frijol, arroz, cebolla) y de forraje (alfalfa, avena, centeno, cebada). Como respuesta a esta preocupación, se han propuesto alternativas promotoras de crecimiento como fertilizantes, tratamientos eustresores (Se le conoce como eustresor a aquellos estímulos que son capaces de estresar de manera “positiva” un organismo con la finalidad de mejorar características deseadas), técnicas de germinación como “*seed priming*” y nutrientes complementarios, cuyo propósito es el de estimular el desarrollo de las plantas. No obstante, tales técnicas en ocasiones resultan ineficientes o con residuos contaminantes importantes, que desencadenan en una serie de situaciones que tornan la problemática inicial aún más complicada.

En este sentido, el tratamiento con nanopartículas metálicas como titanio, plata, cobre, hierro y zinc, así como sus óxidos, han cobrado relevancia como alternativas promotoras de crecimiento, ya que se ha posicionado como opción viable para solucionar las problemáticas anteriormente mencionadas. Derivado de esta situación, surge el interés de estudiar el efecto que puede tener el uso de nanopartículas óxido metálicas en la promoción de crecimiento de las plantas. En particular el uso de TiO_2 y sus derivados dopados con distintos materiales como es el caso de la plata (Ag), esto es de especial interés debido a la amplia disponibilidad y uso cotidiano, como agente blanqueador, para limpieza de aguas residuales, cosmético, alimenticio, etc.

Así mismo, el titanio es considerado como un elemento beneficioso para el

crecimiento de las plantas, la aplicación de titanio en raíces y hojas ha demostrado estimular la actividad de algunas enzimas, generación de clorofila y fotosíntesis, además de promover la absorción de nutrientes, así como la tolerancia al estrés; lo que desemboca en una mejor calidad de cultivo. Algunos fertilizantes comerciales, contienen Titanio, en forma de Titania y Mg-Titanio, que fungen como bioestimulantes para mejorar la producción del cultivo, sin embargo, los mecanismos responsables de estos efectos no son entendidos completamente (Lyu et al., 2017).

No obstante, es importante señalar que los efectos generados por el titanio a macro escala difieren en ocasiones de sus contrapartes a nanoescala, así como de otros tipos de óxidos metálicos. Por esta razón en el presente estudio es de especial interés evaluar los efectos generados por NP de TiO_2 , sobre una planta como es la alfalfa (debido a su versatilidad para ser usada como forraje y alimento), para conocer los efectos tóxicos que estas NPs pueden ocasionar en el proceso de germinación en un rango de concentraciones establecido.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Materiales.

Las semillas de alfalfa fueron adquiridas en “La Semillería” ubicada en el municipio de corregidora, Col. Los Ángeles. Carretera Celaya-Querétaro KM 11.4. Para la obtención de las nanopartículas, se usó isopropóxido de Titanio (grado reactivo) de la marca Sigma Aldrich, la sal dopante AgNO_3 , fue comprada en JT. Baker igualmente de grado reactivo. La morfología fue evaluada con un equipo marca JEOL JSM, modelo 6060 LV. Peabody, Massachusetts. USA, con un voltaje de 15 kV.

6.2 Síntesis de nanopartículas de TiO_2 por método Sol-gel.

Inicialmente la reacción de generación de la fase sol, requiere de un precursor y un solvente. En este caso se utilizaron 10.5 mL el isopropóxido de Titanio (97% Sigma

Aldrich) como precursor, y 102 mL de isopropanol (99% Sigma Aldrich) como solvente orgánico. Se disolvió lentamente el precursor en el solvente orgánico. La solución de titanio fue agitada continuamente por 20 minutos bajo atmósfera de nitrógeno con la finalidad de evitar la oxidación del precursor. Enseguida se realizó el proceso de hidrólisis añadiendo lentamente 101.5 mL de agua a la solución precursor-solvente, posteriormente se continuó agitando por lapso de una hora más la mezcla en completa oscuridad. Para la obtención de la nanopartícula dopada con iones de Ag^+ al 0.1% wt., se añadió nitrato de plata (AgNO_3) (JT. Baker) como sal dopante, previamente disuelta en la solución usada para el proceso de hidrólisis. Una vez que la sal es incorporada a la mezcla precursor-solvente y la reacción de hidrólisis es llevada a cabo; el gel obtenido fue filtrado para el posteriormente secado, molido y calcinado a una temperatura de $450\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Todo el proceso se resume en la Figura 9 (Esquivel et al., 2013).

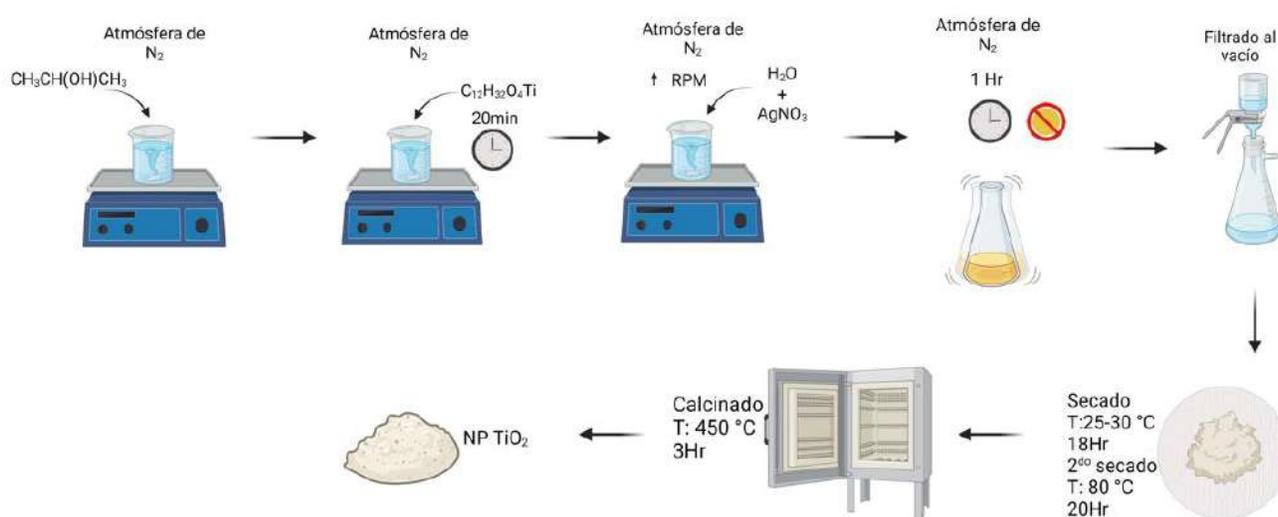


Figura. 9 Esquema gráfico para síntesis de nanopartículas por método sol-gel.

6.3 Caracterización fisicoquímica de los materiales.

La morfología de las muestras será analizada usando la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) con un equipo marca JEOL JSM, modelo 6060 LV. Peabody, Massachusetts. USA, con un voltaje de 15 kV.

El análisis de la estructura cristalina de la muestra se realizará mediante la técnica de difracción de rayos X (XRD) con un equipo marca Bruker modelo D8, (Bruker Nano Inc. Kennewick. WA. USA, equipado con un tubo de cobre sellado para generar radiación Cu K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) con ángulos de $10 < 2\theta < 80^\circ$ en paso de 0.01° .

El análisis vibracional de la red se realizará empleando la técnica de espectroscopía Raman empleando el equipo, marca Horiba Scientific, modelo LabRam HR (Horiba Kyoto. Japan, con un láser de NdYGa ($\lambda=532\text{nm}$).

6.4 Desarrollo de germinación.

Las semillas fueron adquiridas en la semillera local “La Semillería” ubicada en el municipio de corregidora, Col. Los Ángeles. Carretera Celaya-Querétaro KM 11.4. Estas semillas fueron sumergidas en una solución de jabón líquido neutro durante 5min y posteriormente lavadas con agua corriente, en un segundo paso, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 5min y enjuagadas varias veces con agua destilada, finalmente se les retiró el exceso de agua con ayuda de papel absorbente. Posteriormente, las semillas se sometieron a un proceso de imbibición con distintas concentraciones (1, 5, 10 y 15 ppm) del tratamiento por lapso de 2 h, este proceso se realizó por triplicado para cada concentración. Para proveer una dispersión uniforme de las nanopartículas, se realizó un baño ultrasónico (Branson M2800-CPX-HE, Emerson Ferguson, Missouri, USA) por 40 min. Finalmente se colocaron 50 semillas aleatoriamente entre dos capas de papel filtro Whatman no.1 en cajas de Petri (100 x 25 mm) previamente humedecido. Un experimento similar sin tratamiento se realizó a la par

como control. Como método de riego se usó la aspersión diaria según fuera necesario. Finalmente, el periodo de desarrollo se estandarizó a 9 días de crecimiento y tomando como criterio de germinación la aparición de los cotiledones.

6.5 Porcentaje de germinación.

Una vez que se determine y estandarice el proceso de germinación, se procederá con el conteo de las semillas que germinaron hasta el último día de crecimiento, dicho resultado será dividido por el número total de semillas sembradas al inicio del experimento y multiplicadas por cien (ecuación 1); esto con la finalidad de poder realizar un estudio de porcentaje total de emergencia (ET) (Parveen y Rao, 2015).

$$\% E = \frac{\text{No. plántulas emergidas en el último conteo}}{\text{No. de semillas sembradas}} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

6.6 Preparación de extractos.

Para realizar la extracción metanólica, se siguió la siguiente metodología: los germinados previamente recolectados fueron separados por concentraciones (ctrl, 1, 5, 10, 15 ppm) para posteriormente ser molidos en nitrógeno líquido, enseguida fueron macerados en metanol en una proporción de 1:10 (p/v). La suspensión resultante fue protegida de la luz y se colocó en un sonicador (Bransonic M2800-CPX-HE, Emerson Ferguson, Missouri, USA) 20 min, posteriormente fueron centrifugados (Sorvall Biofuge Primo R model 75005448; Thermo Scientific, Osterode, Germany) a 8000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante (extracto fenólico soluble) fue denominado extracto metanólico de los germinados totales y almacenados a 4°C en condiciones oscuridad hasta que fueron usados (Parola-Contreras et al., 2021).

6.7 Cuantificación de flavonoides totales.

Para la cuantificación de los flavonoides totales, se realizó una curva estándar en el

siguiente rango de concentraciones 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ a partir de una solución stock de rutina diluyendo 0.025 gr de rutina en 10 mL de metanol. A continuación, para el análisis de espectroscopía UV-vis se tomó una placa de Elisa en donde se realizó por triplicado la medición del estándar de la siguiente manera: Una alícuota de 50 μL de cada concentración de la solución de rutina se mezcló con 180 μL de agua destilada y 20 μL de 2-aminoetildifenil borato al 1%. Para el blanco se usaron 230 μL de agua destilada y 20 μL de 2-aminoetildifenil borato al 1%. La absorbancia se midió a 404 nm.

Para la cuantificación de flavonoides totales presentes en la muestra orgánica, se usaron 50 μL de extracto metanólico de muestra, 180 μL de agua destilada y 20 μL de 2-aminoetildifenil borato al 1%. De igual forma la placa se midió a una longitud de onda de 404nm en un espectrofotómetro UV-vis (multiskan GO modelo 51119300 de Thermo Scientific, Vantaa, Finland), los resultados son reportados como mg Equivalentes de rutina/gr muestra orgánica (Garcia-Mier et al., 2015).

6.8 Cuantificación de fenoles.

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método de Folin-Ciocalteu (Dewanto et al., 2002). Inicialmente se realizó una curva de calibración usando como estándar ácido gálico (0.1 mg/mL), reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% y agua destilada. La lectura de absorbancia se realizó a 760nm en un espectrofotómetro UV-vis (multiskan GO modelo 51119300 de Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Para la cuantificación en la muestra se usaron 40 μL de extracto metanólico en donde también se agregaron 460 μL de agua destilada, 250 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y 1250 μL de carbonato de sodio en solución al 20%. En ambos casos (curva de calibración y lectura en la muestra) se dejó reaccionar en condiciones de oscuridad por 2 hr para posteriormente medir la absorbancia a 760nm. El blanco se preparó usando el reactivo Folin, Na_2CO_3 y agua destilada. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico/g de extracto.

6.9 Determinación de capacidad antioxidante mediante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

La actividad antioxidante se determinó por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) como se describe en (Garcia-Mier et al., 2021). En principio se realizó un ensayo cinético para analizar el tiempo necesario para neutralizar la actividad de un estándar contra el radical DPPH•. El DPPH• posee una coloración violeta que cambia de acuerdo con la cantidad de electrones donados por una especie reductora, de esta forma, cuando un agente reductor (Trolox) se encuentra en presencia de un oxidante (DPPH) la solución se tornará en un amarillo pálido, por lo tanto, la cinética nos dice el lapso de tiempo en que la reacción alcanza un equilibrio. La cinética se ensayó en un rango de tiempo comprendido entre 0 a 120 min, encontrando mejores resultados en 60 min. La curva se preparó, a partir de un stock Trolox 1mM para distintas concentraciones (50-800 µM), metanol al 80% y reactivo DPPH; posteriormente se graficó la concentración de trolox contra % de inhibición para verificar la actividad del DPPH•. Para el blanco se usaron 20 µL de metanol y 200 µL de H₂O destilada y para el control se usaron 20 µL de metanol y 200 µL de DPPH.

El análisis sobre la muestra se llevó a cabo usando 20 µL de extracto metanólico y 200 µL de DPPH. La lectura se realizó a 520nm en un multiskan GO modelo 51119300 de Thermo Scientific, Vantaa, Finland. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición. A partir de las lecturas observadas se empleó la ecuación 2 para obtener la actividad de eliminación de radicales DPPH•.

$$\%IHB = \left(\frac{Abs_{muestra} - control}{control} \right) * 100 \quad Ec. 2$$

6.10 Determinación de capacidad antioxidante mediante ABTS (Ácido 2,2-azino-bis-3etiltiazolina bencenosulfónico-6).

Para el ensayo de inhibición de radical ABTS, primero se preparó una solución 7mM del reactivo ABTS en agua y una solución 140mM de persulfato de potasio (concentración final), ambas se hicieron reaccionar a temperatura ambiente en un medio oscuro por 12-16hrs antes de usarse, para generar el radical (ABTS^{•+}). Posteriormente se usó metanol para ajustar la absorbancia del radical ABTS^{•+} a 0.700 ± 0.05 nm usando una longitud de onda de 734nm. El ensayo espectrofotométrico sobre la muestra se llevó a cabo con 230 μ L de ABTS^{•+} y 20 μ L de extracto mezclados por 45 segundos y medidos a 734nm después de 5 min. El control se preparó usando 230 μ L de ABTS^{•+} y 20 μ L de metanol, mientras que para el blanco se usaron 230 μ L de etanol y 20 μ L de metanol. La actividad antioxidante de la muestra se calculó mediante la determinación del decrecimiento de la absorbancia con forme a la ecuación 3. Se utilizó como estándar una solución Trolox 1mM. Este ensayo está basado en la habilidad que poseen distintas sustancias de eliminar radicales. La absorbancia fue monitoreada en un multiskan GO modelo 51119300 de Thermo Scientific, Vantaa, Finland. La actividad antioxidante, se obtuvo mediante la ecuación 3 y se expresó como porcentaje de inhibición (Garcia-Mier et al., 2021).

$$\%IHB = \left(1 - \left(\frac{Abs_{muestra} - blanco}{control} \right) \right) * 100 \quad Ec. 3$$

7.0 Actividad enzimática.

7.1 Fenilalanina amonio liasa.

Se mezclaron 100 μ l de extracto enzimático con 1,15 ml de tampón borato 0,1 M/10 mM L Fenilalanina (pH = 8,8). Las muestras se incubaron durante 1 h a 40 °C, se añadieron 0,25 ml de HCl 1 N para detener la reacción. Las muestras se dejaron en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se midió la absorbancia a 290 nm y se comparó con una curva de calibración de ácido

transcinámico

7.2 Superóxido dismutasa

Para determinar la actividad de la SOD, se añadieron 50 μ l de extracto enzimático a una mezcla de reacción que contenía buffer fosfato (50 mM), cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT 98%, Sigma-Aldrich), metionina (Sigma-Aldrich), riboflavina (Sigma-Aldrich) en un volumen total de 2 ml, enseguida, la mezcla se expuso a luz uniforme durante 20 min. La absorbancia se leyó a 560 nm. Una unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima que inhibe la tasa de reducción de NBT en un 50% en las condiciones de ensayo anteriores.

7.3 Catalasa

La determinación de actividad enzimática catalasa usó 30 μ l de extracto enzimático después se mezclaron con 100 μ l de peróxido de hidrógeno 100 mM en 1,9 ml de buffer fosfato (50 mM). La disminución de absorbancia se midió a 240 nm durante 1 min. Una unidad de actividad CAT equivale a 1 μ mol de H_2O_2 degradado por minuto.

7. RESULTADOS.

7.1.0 Caracterización de Nanopartículas.

7.1.1 Microscopía electrónica de Barrido (SEM).

La Figura 10a muestra la micrografía SEM de la muestra de TiO_2 . La morfología de la superficie observada a una magnificación de 2500x para las nanopartículas sintetizadas mediante la técnica sol-gel. Se observa una morfología amorfa y aglomerada, además se observan cristales de menor tamaño sobre la superficie de las partículas más grandes, teniendo estas una morfología ovalada o esférica en algunos casos. La Figura 10 b, muestra la micrografía SEM de $Ag-TiO_2$ con magnificación de 2000x, en donde se pueden observar morfologías igualmente amorfas, con distribución aglomerada y con presencia de partículas de menor tamaño sobre las estructuras de mayor tamaño.

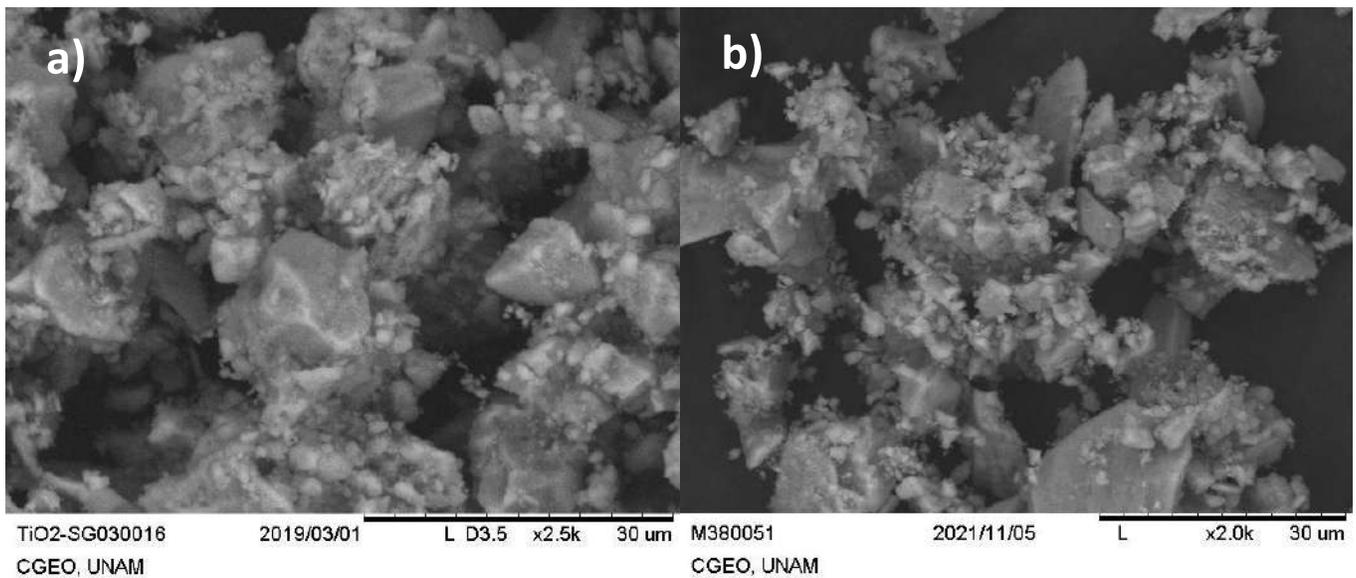


Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de TiO_2 (figura a) y Ag-TiO_2 (figura b) sintetizadas por método sol-gel.

7.1.2 Difracción de rayos (XRD).

La Figura 11 exhibe los patrones de difracción de rayos X correspondientes a las nanopartículas de TiO_2 y Ag-TiO_2 , sintetizadas mediante la metodología de sol-gel. En estas se pueden apreciar los ángulos 2θ (25.1° , 37.7° , 47.8° , 53.6° , 54.8° , 62.5° , 68.7° , 70.1° y 75.1°). Se observaron señales con mayor intensidad para el plano (101) en ambos casos, lo que sugiere un crecimiento preferencial de la fase anatasa, al mismo tiempo no se presentó señal alguna que sugiera otra fase cristalina (rutilo). Así mismo no se registraron señales relacionadas con el dopante (Ag) debido a la baja concentración.

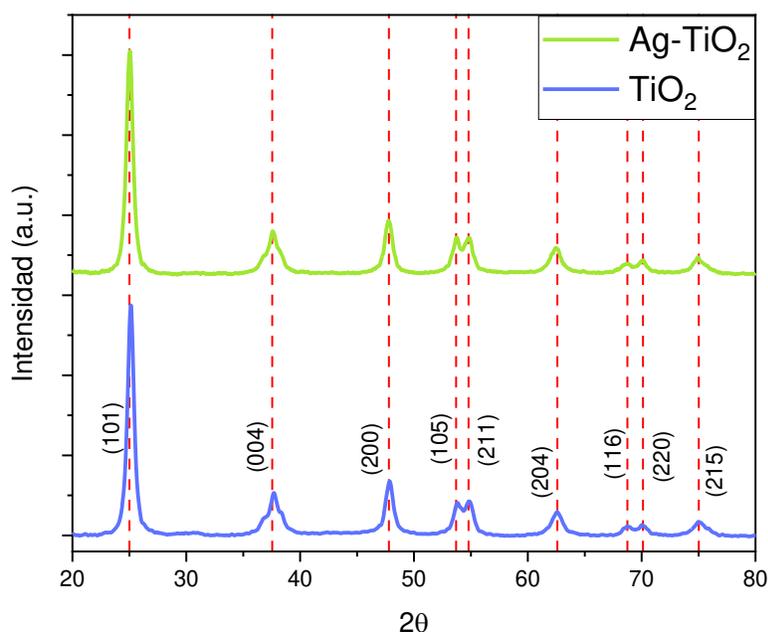


Figura 11. Patrón de difracción de rayos X para nanopartículas sintetizadas mediante técnica sol-gel.

Los tamaños de cristalito para ambas nanopartículas fueron calculados mediante dos métodos, la ecuación de Scherrer y Williamson-Hall. Esto debido a que, con la segunda, es posible considerar los efectos de compresión y relajación que experimental estructura cristalina. La Tabla 1 resume los resultados obtenidos por ambos métodos. Se obtuvieron tamaños de cristalito distintos dependiendo del método, en primer lugar, mediante Scherrer el tamaño promedio fue de 9 nm, mientras que Williamson-Hall arrojó tamaños de 17 nm en promedio. El porcentaje de cristalinidad ascendió a más del 90%.

Tabla 1

Tamaños de nanopartícula calculados a partir de métodos Williamson-Hall y Scherrer, grado de cristalinidad y constante de estrés.

	Scherrer (nm)	Williamson -Hall (nm)	Constante de estrés (ϵ)	Cristalinidad * (%)
TiO ₂	8.65	19.80	0.0047	93.94

*Grado de cristalinidad (%)

7.1.3 Espectroscopía Raman.

Como es posible observar en la espectroscopía Raman, están presentes los modos vibracionales característicos de los materiales de interés (TiO₂ y Ag-TiO₂), esta técnica es ampliamente usada como complemento a la difracción de rayos X con el objetivo de reconocer las fases cristalinas presentes en la muestra. En la Figura 12 se muestran los espectros de las muestras correspondientes a TiO₂ y Ag-TiO₂, ambas sintetizadas mediante la técnica sol-gel. Están presentes las señales en 142.7, 396.8, 517 y 637.7 cm⁻¹, indicativo de la presencia de la fase cristalina anatasa, de la misma forma no se presentaron señales correspondientes con las fases brokita y rutilo. No obstante, no se presentaron señales correspondientes al dopante (Ag), presumiblemente debido a la baja concentración y por ende baja presencia en TiO₂.

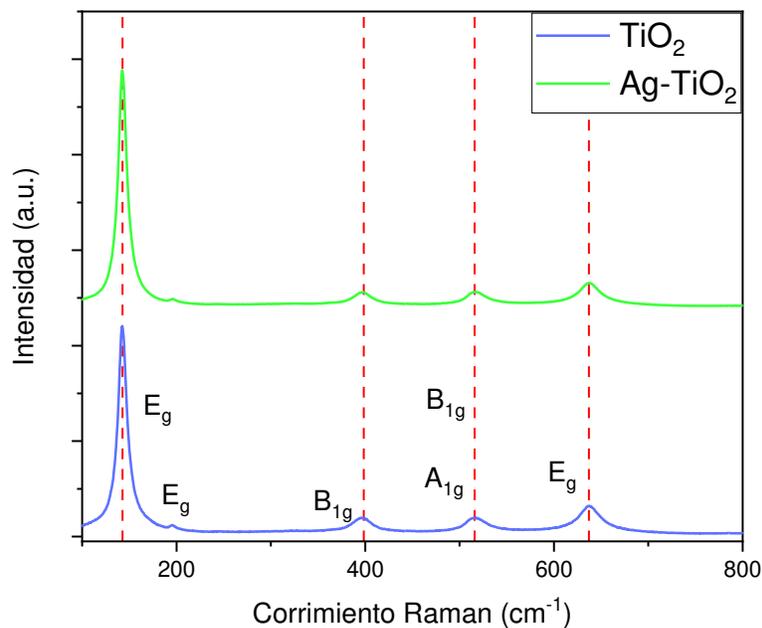


Figura 12. Espectro Raman de las nanopartículas TiO₂ y Ag-TiO₂ sintetizados mediante técnica Sol-gel.

7.2.0 Morfología de germinados.

Las semillas fueron monitoreadas de igual manera en ambos tratamientos, siendo el criterio de crecimiento un periodo de 9 días, mismo que se encuentra dentro del rango de tiempo propuesto por las normas ISTA (Association, s/f), así como la temperatura y el porcentaje de humedad. Estos datos fueron verificados experimentalmente cada día; teniendo un promedio de 20.8 °C y 51.5 % de humedad, estos parámetros fueron registrados con ayuda de un higrostató marca inkbird modelo IHC-200 y un sensor de temperatura de marca Steren modelo TER-150. Posteriormente se aplicaron los tratamientos de TiO₂ y Ag-TiO₂ a grupos de 50 semillas realizando 3 repeticiones.

7.2.1 Porcentaje de germinación.

Se registraron los siguientes porcentajes de germinación para las semillas tratadas con TiO₂: 86 % para el control, 88.6 % para 1 ppm, 92 % para 5 ppm, 89.3 % para 10ppm y 90.6 % para 15 ppm. En tanto que para el tratamiento con nanopartículas de Ag-TiO₂ se obtuvo 83.3 % para el control, 94.6 % para 1 ppm, 92.6 % para 5 ppm, 90% para 10 ppm y 95.3 % para 15 ppm. Todas las semillas tratadas se estandarizaron a un tiempo de crecimiento de 9 días.

7.2.2 Peso fresco.

El peso fresco obtenido para los tratamientos de TiO₂ y Ag-TiO₂ fue registrado después de nueve días de crecimiento. En la Figura 13, es posible apreciar que los datos obtenidos en gramos (gr) de TiO₂, mismo que difieren al menos porcentualmente (Tabla 2), de los del tratamiento con Ag-TiO₂. En el primero (TiO₂), se observaron incrementos de biomasa en todas las concentraciones empleadas en un rango comprendido entre 4 y 8 % respecto al control, sin una diferencia significativa entre uno y otro. En contraste, los resultados obtenidos para el

tratamiento con Ag-TiO₂ exhibieron un comportamiento inhibitorio en la totalidad de las concentraciones ensayadas que fue del 1 al 7 %. De forma similar al primer tratamiento, estas reducciones de peso no fueron significativas respecto al control y el efecto inducido por cada concentración empleada no difirió en ningún caso.

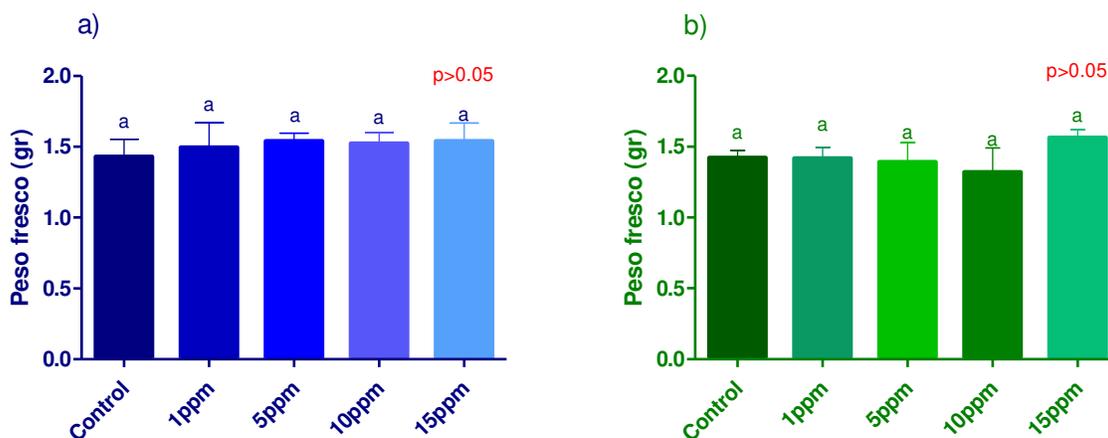


Figura 13. a) peso fresco de germinados de alfalfa tratados con TiO₂, b) peso fresco de germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO₂. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las modificaciones de peso fresco generadas a partir de los tratamientos (con TiO₂ y Ag-TiO₂), se resumen en la Tabla 2. Estas modificaciones se reportan como una variación porcentual respecto al grupo de control.

Tabla 2

Modificaciones del peso fresco en germinados de alfalfa.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Cambio porcentual [†] (%)
Control	0	100
TiO ₂	1	4
	5	8

	10	6
	15	8
Ag-TiO ₂	1	-1
	5	-2
	10	-7
	15	7

* Diferencia porcentual registrada entre el peso fresco de los germinados afectados por las distintas concentraciones de TiO₂ y Ag-TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores negativos señalan pérdida de peso respecto al control. † Promoción o inhibición de crecimiento respecto al control.

En el análisis del primer tratamiento, se observa que a medida que aumenta la concentración de TiO₂, se produce un aumento en la biomasa generada, sin embargo, dicho incremento no es significativo ($p > 0.05$), lo cual sugiere que el TiO₂ puede tener un efecto positivo en el crecimiento de las plantas. Además, se observa que las concentraciones de 5 y 15 ppm inducen un mayor incremento porcentual, aproximadamente del 8 %, en comparación con el control. Este resultado puede estar relacionado con la capacidad del TiO₂ para estimular el proceso de fotosíntesis, lo cual puede aumentar la producción de biomasa.

Para el tratamiento de Ag-TiO₂, se registró un descenso en la producción de biomasa para la mayoría de las concentraciones, afectando la producción de peso fresco a medida que la concentración aumenta. Para la concentración de 1 ppm se tiene una baja de 1 % y de 2 % para la de 5 ppm, siendo despreciable la diferencia respecto al control, mientras que la concentración de 10 ppm presenta una baja del 7 % y la de 15 ppm al contrario que las demás concentraciones, presentó un aumento en la producción de biomasa del 7 %.

No obstante, es importante señalar, que los cambios porcentuales a partir del control, no son estadísticamente significativos, pues en ningún caso, estos

presentaron una $p < 0.05$ para el análisis de Tucky y Dunnett.

7.2.3 Longitud de radícula.

La longitud de la radícula fue medida a partir de la bifurcación de los cotiledones, es decir de las primeras hojas verdaderas hasta la punta del brote. Estas medidas se registraron después de 9 días de crecimiento en condiciones de humedad y temperatura estandarizadas.

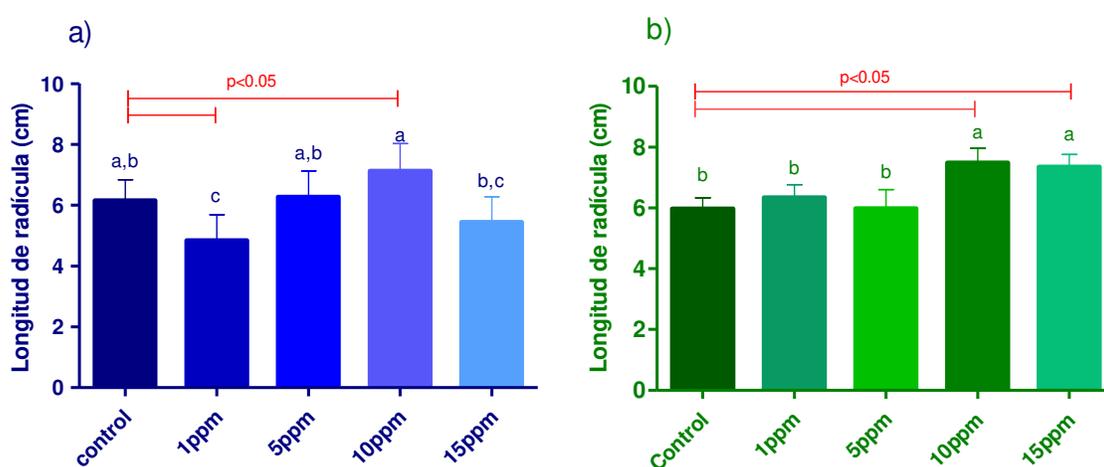


Figura 14. a) Longitud de radícula de alfalfa tratados con TiO₂, b) Longitud de radícula de germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO₂. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$).

Como es posible observar en la Figura 14a, correspondiente al tratamiento con TiO₂, el efecto de las NP aumenta gradualmente sobre la longitud de la radícula y después decae, presentando su máxima incidencia en la concentración de 10 ppm. Se observaron incrementos del 2 y 16 % de longitud respecto al control para las concentraciones de 5 y 10 ppm, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de 1 y 15 ppm, exhibieron comportamientos inhibitorios del 21 y 12 %, respectivamente, igualmente respecto al control.

Para el tratamiento de Ag-TiO₂, en la figura 14b, se observa que las concentraciones

de 10 y 15 ppm producen promociones en la longitud de la radícula de las plántulas en comparación con el control. La longitud de radícula incrementó aproximadamente un 25 % respecto al control, en tanto que las concentraciones de 1 y 5 ppm registraron un crecimiento similar al control. El efecto promotor es más notable en concentraciones altas (10 y 15 ppm); se observó una respuesta proporcional a la concentración empleada. La promoción de crecimiento fue discreta siguiendo una tendencia más o menos en orden ascendente al incrementar la dosis de tratamiento. En particular, se destaca que la concentración de 10 ppm propició efecto promotor significativo en el desarrollo de las radículas. Se sugiere que las 10 ppm puede generar un estímulo positivo en el crecimiento de las radículas para ambos tratamientos, aunque este incremento sea discreto ($p > 0.05$). Estas modificaciones morfológicas se reportan como cambios porcentuales respecto al control en la Tabla 3.

Tabla 3

Modificaciones de longitud radicular en germinados de alfalfa.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Cambio porcentual[†] (%)
Control	0	100
	1	-21
	5	2
	10	16
	15	-12
TiO ₂	1	6
	5	0
	10	25
	15	23

* Diferencia porcentual de longitud radicular registrada entre los germinados afectados por las distintas concentraciones de TiO₂ y Ag-TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores negativos señalan inhibición de crecimiento respecto al control. † Promoción o inhibición de crecimiento respecto al control.

La Tabla 3 muestra que, en ambos tratamientos (TiO₂ y Ag-TiO₂) se observó una distinción muy marcada de promoción e inhibición. Cuando se usó TiO₂, todas las concentraciones probadas en general produjeron un comportamiento bien marcado en cuanto a promoción o inhibición, destacando la concentración de 10 ppm como la de mayor incidencia promotora y la de 1 ppm como inhibitoria. Es decir que el efecto se presentó proporcionalmente con el incremento de concentración. Algo similar ocurrió con el tratamiento de Ag-TiO₂ donde las concentraciones de 1 y 5 ppm no provocaron un efecto significativamente distinto entre ellas, así como las de 10 y 15 ppm en donde el efecto tampoco difirió entre ellas. Finalmente se retoma énfasis en la concentración con la mejor incidencia positiva, 10 ppm.

7.2.4 Clorofila (mediciones SPAD).

En esta sección se presentan los datos registrados a partir de las mediciones realizadas en las hojas verdaderas de los germinados después de cumplir con el periodo de crecimiento establecido de 9 días. Dichas mediciones de pigmentación se llevaron a cabo con ayuda de un SPAD 502 Plus Minolta.

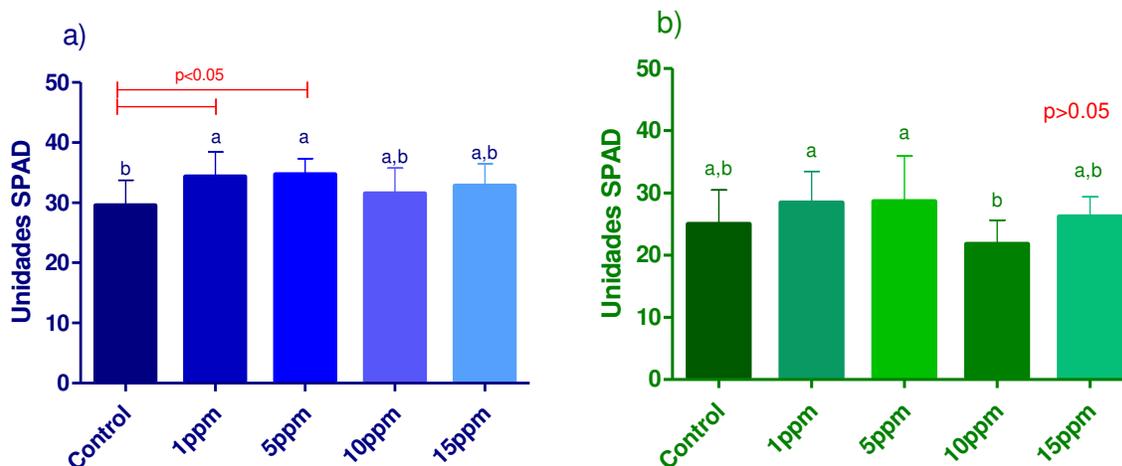


Figura 15. Efecto de NPs de TiO₂ (figura a) y Ag-TiO₂ (figura b) sobre unidades SPAD correspondientes con la pigmentación de hojas verdaderas en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$).

De acuerdo con la Figura 15, la cantidad de unidades SPAD evaluadas en las hojas para cada concentración de TiO₂, mostraron variaciones no mayores al 6 % entre ellas, alcanzando un porcentual máximo en 17 %. La concentración de 15 ppm presentó un aumento del 11 % respecto al control, mientras que la concentración de 10 ppm presentó el menor índice de cambio con un 7 %. Según la prueba de Tuckey, las concentraciones de 1 y 5 ppm no mostraron diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). Es destacable que no se observó ninguna diferencia clara entre el uso de una concentración en particular, ya que las lecturas obtenidas no difirieron de manera significativa entre sí con una $p > 0.05$.

De manera similar, el tratamiento con Ag-TiO₂, presentó comportamientos promotores de pigmentación similares en las concentraciones de 1, 5 y 15 ppm sin diferencia significativa entre estas. A diferencia de las concentraciones anteriormente mencionadas, 10 ppm si tuvo un efecto significativamente distinto al de las demás, provocando una reducción del 28 % respecto al máximo incremento generado por la concentración de 5 ppm. Dichos comportamientos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Modificaciones en los valores SPAD, correspondientes al cambio de pigmentación en hojas verdaderas de germinados de alfalfa.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Cambio porcentual[†] (%)
Control	0	100
	1	16
	5	17
	10	7
	15	11
TiO ₂	1	14
	5	15
	10	-13
	15	5

* Diferencia porcentual en unidades SPAD proporcionales con el cambio de pigmentación en hojas verdaderas, registrada entre los germinados afectados por las distintas concentraciones de TiO₂ y Ag-TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores negativos señalan pérdida de coloración respecto al control. † Promoción o inhibición de crecimiento respecto al control.

El análisis de pigmentación, exhibe un comportamiento similar para ambos tratamientos, en concentraciones específicas (1 y 5 ppm). En un primer escenario, el tratamiento con TiO₂ indujo un incremento de pigmentación en todas las concentraciones evaluadas con cambios significativos respecto al control en las primeras concentraciones (1 y 5 ppm), como se observa en la Figura 15; no obstante, el incremento porcentual generado cuando se usaron 10 y 15 ppm, no significó un cambio importante respecto al control, aunque si se observó un cambio en la intensidad del color de las hojas, este no fue muy distinto del grupo de control.

En un segundo escenario, el tratamiento de Ag-TiO₂ produjo incrementos de pigmentación en las concentraciones de 1, 5 y 15 ppm, no obstante, esta promoción de pigmentación no resultó significativa respecto al control, aunque porcentualmente estos cambios fueron desde un 5 a 15 %.

Al mismo tiempo, se presentó un descenso de pigmentación respecto al control cuando se usó 10 ppm de Ag-TiO₂. Se destaca que esta concentración tuvo un efecto negativo, sobre la pigmentación, ya que existió una inhibición de coloración del 13 %. Como se enfatiza anteriormente, ambos tratamientos fueron afectados por las mismas concentraciones, proporcionalmente similares, siendo significativo solo el efecto generado por el tratamiento con TiO₂. De manera general, el cambio en la pigmentación, se atribuye al tratamiento con nanopartículas y a la falta de micronutrientes, debido a que el experimento se diseñó con la intención de cuidar factores externos que pudieran afectar el desarrollo de germinación, se decidió usar una técnica con papel que no contempla la utilización de ningún tipo de medio enriquecido o tierra común. No obstante, la intensidad del pigmento, guarda relación con la absorción de nitrógeno por parte de la plántula, lo que podría sugerir un factor a considerar en la intensidad del verde de las hojas.

7.2.5 Longitud y anchura de hojas.

En esta sección se presentan los datos registrados a partir de las mediciones realizadas en las hojas verdaderas de los germinados después de cumplir con el periodo de crecimiento establecido de 9 días. Ambos parámetros (largo y ancho) se presentan en conjunto y tomando mediciones de las tres repeticiones con un Vernier.

7.2.6 Ancho de hojas.

Como se aprecia en la Figura 16a, se generaron efectos promotores de crecimiento en las concentraciones de 5 y 10 ppm correspondientes al 13 y 4 % respectivamente. Así mismo un efecto inhibitorio se presentó para las concentraciones de 1 y 15 ppm equivalentes al 49 %. La tendencia registrada para el ancho de las hojas con el tratamiento de TiO₂, fue muy similar al comportamiento

generado para la longitud de radícula, generando el punto de mayor efecto promotor en las 5 ppm. Es importante destacar que el efecto promotor en el crecimiento de las hojas para la concentración de 5 ppm no es estadísticamente significativo, según las pruebas de Tuckey y Dunnett ($p < 0.05$), mientras que el descenso de tamaño en el ancho de las hojas sí.

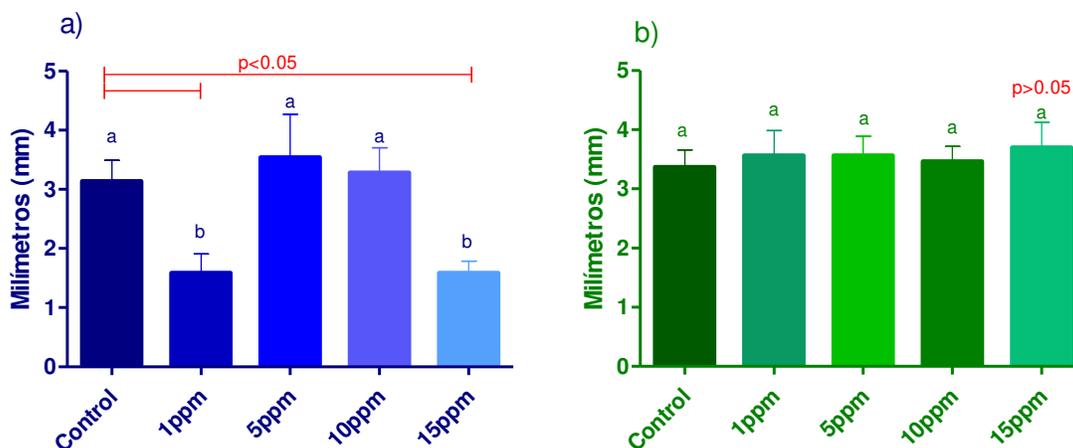


Figura 16. Efecto de NPs de TiO_2 (figura a) y Ag-TiO_2 (figura b) sobre el ancho de hojas verdaderas en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$).

Para el tratamiento con Ag-TiO_2 (Figura 16b), se registró una variación de crecimiento inversa al primer tratamiento con TiO_2 . En este caso existió una promoción en la anchura de las hojas, que fue del 3 al 11 % para todas las concentraciones probadas, encontrando el mayor efecto promotor de crecimiento en las 15 ppm y la menor en 10 ppm. De forma similar a la anterior, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En resumen, el tratamiento con TiO_2 produce efectos tanto promotores como inhibidores en el ancho de las hojas, dependiendo de la concentración utilizada. Además, se observa una tendencia similar en el comportamiento del ancho de las hojas y la longitud de las raíces, aunque los efectos en el ancho de las hojas no son estadísticamente significativos. Así mismo el tratamiento con Ag-TiO_2 produjo efectos promotores en el crecimiento de la anchura de las hojas, independientemente de la concentración utilizada, aunque estas diferencias no

fueron estadísticamente significativas.

Se muestra en la Tabla 5 las variaciones porcentuales, para cada uno de los tratamientos y sus respectivas concentraciones.

Tabla 5

Modificaciones en el ancho de hojas verdaderas de los germinados de alfalfa.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Cambio porcentual[†] (%)
Control	0	100
	1	-49
	5	13
	10	4
TiO ₂	15	-49
	1	6
	5	6
Ag-TiO ₂	10	3
	15	11

* Diferencia porcentual en la anchura de hoja registrada entre los germinados afectados por las distintas concentraciones de TiO₂ y Ag-TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores negativos señalan inhibición de tamaño respecto al control. † Promoción o inhibición de crecimiento respecto al control.

7.2.7 Longitud de hojas

En esta sección se presentan los datos de la longitud de las hojas verdaderas registrados después de 9 días de crecimiento con tratamiento de TiO₂ y Ag-TiO₂. Este parámetro se midió tomando en cuenta los extremos superior e inferior de la

hoja solamente y de forma vertical.

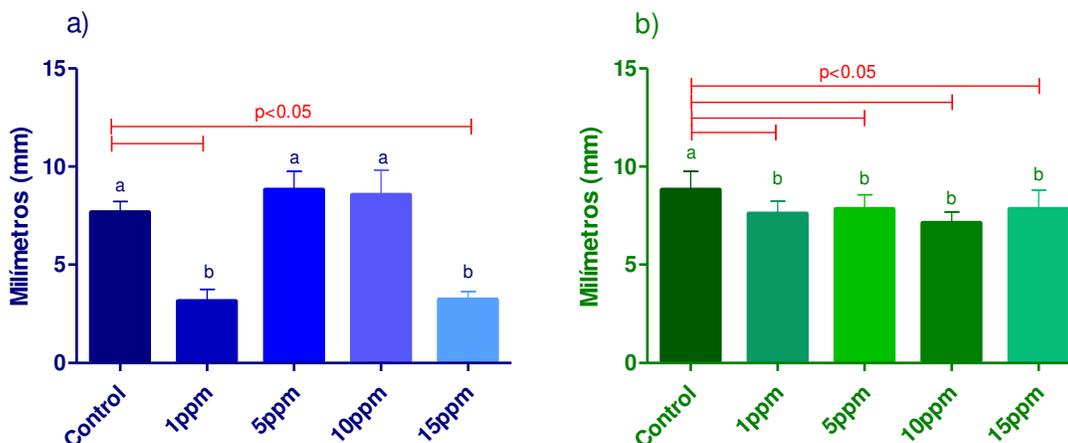


Figura. 17. Efecto de NP's de TiO₂ (figura a) y Ag-TiO₂ (figura b) sobre la longitud de hoja verdadera en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios fue analizada usando pruebas de Dunnett y Tuckey con una $p < 0.05$. Los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones. Las barras rojas señalan diferencias significativas de los tratamientos respecto al grupo de control.

La Figura 17 muestra que, con el primer tratamiento de TiO₂, los germinados presentaron inhibición del crecimiento para las concentraciones extremo, es decir 1 y 15 ppm con un promedio del 59 % respecto al control, por otro lado, las concentraciones de 5 y 10 ppm generaron una promoción discreta en el crecimiento de las hojas, alcanzando un promedio del 12 %. Teniendo el punto de crecimiento máximo en la concentración de 10 ppm y el más bajo en la concentración de 1 ppm. No obstante, la diferencia estadística, entre las concentraciones promotoras y el control no es significativa, según las pruebas de Tuckey y Dunnett, no siendo así para las concentraciones con los efectos inhibitorios, mismos que presentan una $p < 0.05$. Esto sugiere un efecto con mayor impacto en el crecimiento de este parámetro para las concentraciones extremo.

Para el tratamiento con Ag-TiO₂, los germinados presentaron descenso en el crecimiento respecto al control. Todas las concentraciones del tratamiento, promovieron reducciones en la longitud de las hojas. Para todas las concentraciones el porcentaje de inhibición fue del 11 al 17 %, teniendo su punto máximo en las 10 ppm, estas diferencias de crecimiento resultaron ser estadísticamente distintas,

respecto al control con una $p < 0.05$.

A continuación, se muestra en la Tabla 6 las variaciones porcentuales respecto al control para cada uno de los tratamientos y sus respectivas concentraciones.

Tabla 6

Modificaciones en la longitud de hojas verdaderas de los germinados de alfalfa.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Cambio porcentual[†] (%)
Control	0	100
	1	-59
	5	13
	10	11
TiO ₂	15	-58
	1	-14
	5	-11
	10	-17
Ag-TiO ₂	15	-12

* Diferencia porcentual en la longitud de hoja registrada entre los germinados afectados por las distintas concentraciones de TiO₂ y Ag-TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores negativos señalan inhibición de tamaño respecto al control. † Promoción o inhibición de crecimiento respecto al control.

Continuando con el segundo tratamiento con Ag-TiO₂. En cuanto al efecto generado sobre el largo de las hojas, no hay diferencia significativa entre una concentración y otra, sin embargo, esta si existe entre el control y las concentraciones del tratamiento. Estas parecen tener un impacto negativo sobre la longitud de la hoja,

ya que inhiben su desarrollo. De forma contraria, el ancho de la hoja sufrió un impulso en su crecimiento (Figura 16b), generando cambios morfológicos que provocaron que las hojas adoptaran formas parecidas a gotas, mismos que difieren con la morfología de las hojas control, cuya simetría es más bien ovalada. La concentración de 10 ppm generó o promociones discretas ($p > 0.05$) o inhibiciones significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo de control en relación con el tamaño y con los valores SPAD, cuyas magnitudes son proporcionales con la pigmentación de las hojas. Sin embargo, es importante señalar que esta relación no es totalmente congruente con el uso de una u otra concentración en particular, exceptuando la de 10 ppm. Al menos para el tratamiento con NP dopadas, el efecto morfológico en las hojas resultó inconcluso, ya que no es evidente una tendencia de crecimiento o inhibición.

8.0 Perfil Metabólico en germinados de alfalfa tratados con nanopartículas TiO_2 y Ag-TiO_2 , sintetizadas por medio de sol gel.

La determinación de contenido metabólico (fenoles totales, flavonoides totales) así como la actividad antioxidante (% de inhibición de radicales DPPH^{**} y ABTS^{**}), fue obtenida a partir de germinados completos, incluyendo radícula y hojas verdaderas.

8.1.1 Curvas de Calibración empleadas en la cuantificación de metabolitos secundarios y actividad antioxidante.

8.1.1.1 Curva estándar para determinación de fenoles totales.

Previo a realizar la cuantificación de metabolitos y actividad antioxidante, fue necesaria la preparación de curvas de calibración, para cada uno de los ensayos realizados, la Tabla 7 muestra los datos obtenidos para las concentraciones correspondientes de ácido gálico con sus respectivas absorbancias. Se obtuvo una recta con una R cuadrada de 0.99 (Figura 18) significando un ajuste lineal excelente que puede ser usado para las mediciones de las muestras, correspondiente al análisis de fenoles totales.

Tabla 7

Concentración de Ácido Gálico.	Absorbancia $\lambda=760\text{nm}$
0	0.0900
20	0.1115
40	0.1170
60	0.1474
80	0.2197
100	0.2202
120	0.3275
140	0.3333
160	0.3621

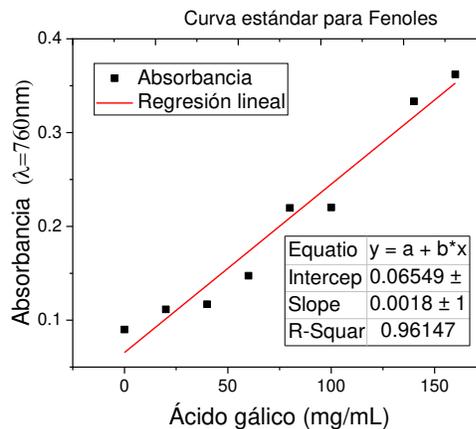


Figura 18. Curva de calibración para Fenoles.

8.1.1.2 Curva estándar para determinación de flavonoides totales.

En las Tabla 8 y Figura 19, se muestran absorbancias correspondientes al ajuste lineal para la curva de calibración de la solución Rutina y sus respectivas concentraciones. Esta curva fue utilizada para realizar una regresión lineal obteniendo una R cuadrada de 0.96 significando un ajuste lineal aceptable para la medición de flavonoides.

Tabla 8

Concentración de Rutina.	Absorbancia $\lambda=404\text{nm}$
0	0
2	0.0687
5	0.0715
10	0.0744
25	0.0769
50	0.0897
100	0.1029
150	0.1242
200	0.1260

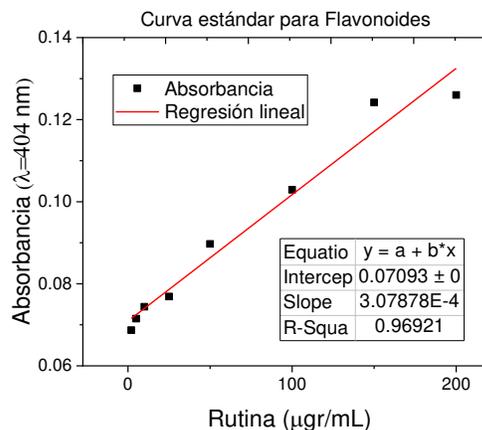


Figura 19. Curva de calibración para Flavonoides.

8.1.2.1 Estándar de calibración para determinación de actividad antioxidante mediante inhibición de radical ABTS^{•+}.

En la Tabla 9 y Figura 20, se muestran la curva de calibración y sus correspondientes concentraciones de solución de Trolox, estas fueron utilizadas para medir el porcentaje de inhibición y la capacidad antioxidante en los extractos de germinado. Se obtuvo a través de una regresión lineal una R cuadrada de 0.98, significando un valor aceptable para calcular las mediciones de actividad antioxidante por la técnica ABTS.

Tabla 9

Concentración de Trolox.	Absorbancia $\lambda=734\text{nm}$
50	0.6049
100	0.5282
200	0.4108
300	0.3215
400	0.1859
500	0.0621
600	0.0492
700	0.0464
800	0.0449

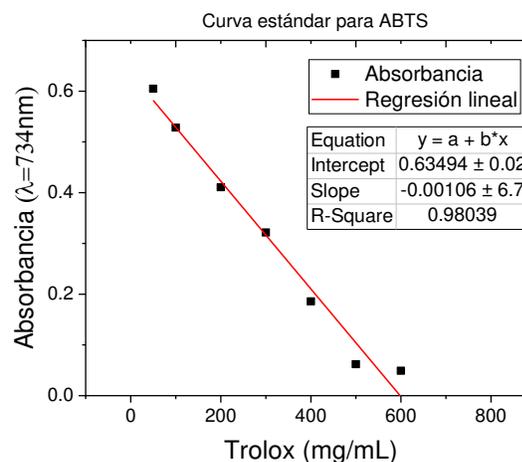


Figura 20. Curva de calibración para ABTS.

8.1.2.2 Estándar de calibración para determinación de actividad antioxidante mediante inhibición de radical DPPH^{•+}.

Enseguida se muestran la Tabla 10 y Figura 21 correspondientes a la curva de calibración y sus respectivas concentraciones de solución de Trolox, estas fueron utilizadas para medir el porcentaje de inhibición y la capacidad antioxidante en los extractos de germinado. Se obtuvo a través de una regresión lineal una R cuadrada de 0.98, significando un valor aceptable para calcular las mediciones de actividad antioxidante por la técnica DPPH.

Tabla 10

Concentración de Trolox.	Absorbancia $\lambda=520\text{nm}$
50	0.4624
100	0.4311
200	0.3568
300	0.3252
400	0.2355
500	0.2060
600	0.1199
700	0.0877
800	0.0725

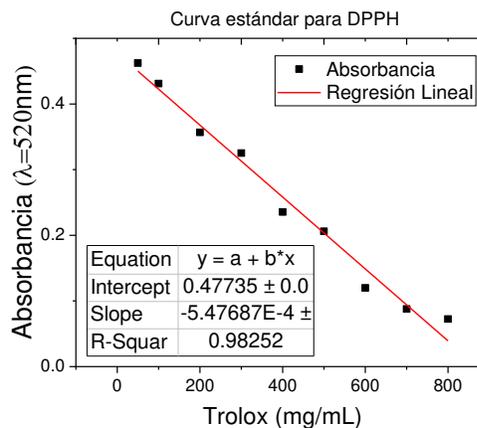


Figura 21. Curva de calibración para DPPH.

8.2.1 Determinación de fenoles totales en germinados con tratamiento de TiO_2 y Ag-TiO_2 .

En esta sección se presentan las mediciones de fenoles totales, realizadas para los extractos con un periodo de 9 días de crecimiento, tratados con TiO_2 y Ag-TiO_2 sintetizado a partir de la técnica sol-gel. Los resultados son mostrados en la Figura 22 y se expresan en mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra orgánica con respecto al control.

Para el primer tratamiento con TiO_2 (Figura 22a), se observó un incremento en la cantidad de fenoles totales que va desde 8 a un 68 %. Estos fueron de 1 ppm (12 %), 5 ppm (8 %), 10 ppm (46 %) y 15 ppm (68 %), respecto al control. Es notable la incidencia del tratamiento ($p < 0.05$) sobre la promoción de fenoles presentes en el extracto, destacan las concentraciones de 10 y 15 ppm. Por otro lado, las concentraciones de 1 y 5 ppm provocaron una promoción similar, sin presentar alguna diferencia significativa ($p > 0.05$). Para el segundo tratamiento con Ag-TiO_2 (Figura 22b), se registró un comportamiento completamente distinto, pues las

concentraciones con mayor índice de producción de fenoles totales respecto al control fueron las de 5 y 15 ppm. Las variaciones promotoras porcentuales respecto al control fueron de 5 ppm (62 %), 10 ppm (15 %) y 15 ppm (29 %), mientras que la concentración de 1 ppm generó una respuesta ligeramente inhibitoria del 2 %. Los efectos inducidos por las concentraciones de 10 y 15 ppm presentaron una $p > 0.05$ entre ellas, lo que sugiere comportamientos en promedio similares. Finalmente, el tratamiento con 5 ppm indujo una respuesta promotora mucho más evidente, en comparación con las demás y el grupo de control, siendo esta la que mayor incidencia tuvo sobre el aumento de fenoles totales.

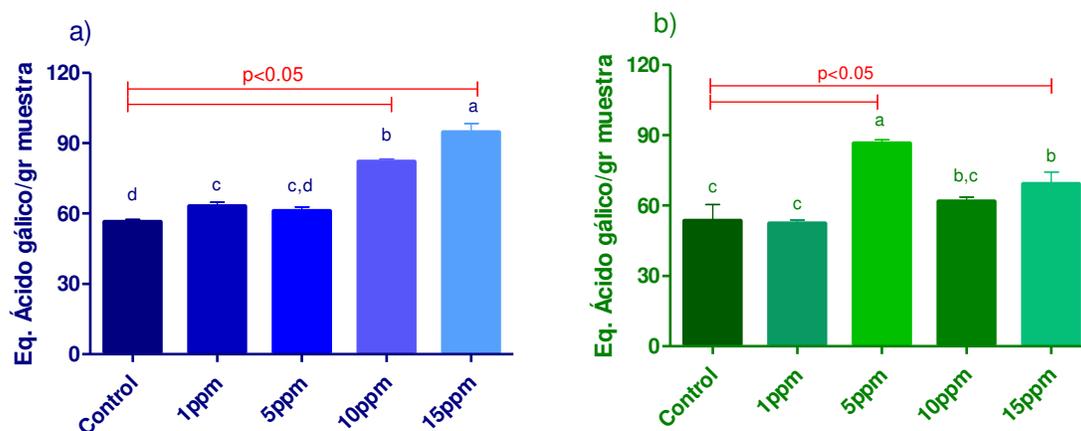


Figura. 22. Efecto de NPs de TiO_2 (figura a) y de Ag-TiO_2 (figura b) sobre fenoles totales en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.2.2 Determinación de flavonoides totales en germinados con tratamiento de TiO_2 y Ag-TiO_2

Esta sección se presentan las mediciones de flavonoides totales, realizadas en los extractos de los germinados con un periodo de 9 días de crecimiento tratados con nanopartículas de TiO_2 y Ag-TiO_2 , sintetizadas a partir de la técnica sol-gel. Los resultados se expresan en mg equivalentes de rutina/g de muestra orgánica con respecto al control.

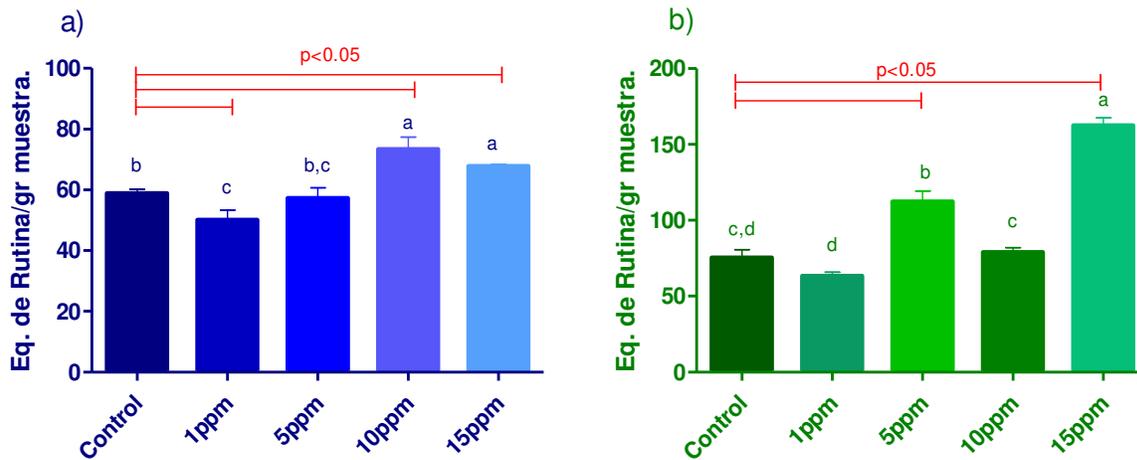


Figura. 23. Efecto de NPs de TiO₂ (figura a) y de Ag-TiO₂ (figura b) sobre flavonoides totales en germinados de alfalfa. La comparación entre los promedios usando la prueba de Tuckey se señala con letras, los promedios con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La comparación de los promedios con el control, usando la prueba de Dunnett, se señala con las barras rojas, los promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados para los flavonoides totales cuando se usó TiO₂ (Figura 23a) muestran un comportamiento dependiente de las concentraciones, es decir que a medida que estas aumentan, el efecto en los niveles de flavonoides se ven reflejados por igual. Se registraron inhibiciones discretas ($p > 0.05$) en 1 ppm (15 %) y 5 ppm (3 %). Por otro lado; se obtuvieron resultados promotores ($p < 0.05$) respecto al control, en los niveles de flavonoides totales en 10 ppm (25 %) y 15 ppm (15 %). Sin embargo, aunque el índice promotor que presentó por la concentración de 10 ppm fue mayor que en las 15 ppm, no existe una diferencia significativa entre ellas, aunque porcentualmente la diferencia sea notable.

Por otro lado, el tratamiento con Ag-TiO₂ (Figura 23b) exhibió un comportamiento promotor en la producción de flavonoides totales en las concentraciones de 5, 10 y 15 ppm, mientras que la concentración de 1 ppm tuvo un efecto inhibitorio. Las concentraciones de 5 y 15 ppm mostraron un mayor incremento porcentual ($p < 0.05$) en la producción de flavonoides totales, con un aumento del 49 % y 116 % respectivamente, en comparación con el grupo de control. Por otro, los efectos observados para las concentraciones de 1 y 10 ppm no fueron significativamente distintos al control ($p > 0.05$). En otras palabras, aunque estos efectos sugieren

cambios discretos en la producción de flavonoides totales, no fueron significativamente diferentes de los observados en el grupo control. Sin embargo, es importante destacar que cuando se usó 1 ppm, los niveles de flavonoides descendieron un 16 %. Lo que es consistente con los resultados obtenidos para los fenoles totales en esta misma concentración y tratamiento. En general, el tratamiento con Ag-TiO₂ exhibió una mayor promoción en la producción de flavonoides totales en comparación con el tratamiento con TiO₂ sin dopar. La concentración de 15 ppm en ambos tratamientos indujo una mayor cantidad de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides totales) respecto al control, siendo notablemente mayor el efecto promotor con el tratamiento de Ag-TiO₂.

8.2.3 Determinación de Capacidad antioxidante en germinados con tratamiento de TiO₂ y Ag-TiO₂.

8.2.4 Actividad estabilizadora de radical DPPH^{•+} en germinados tratados con TiO₂ y Ag-TiO₂.

Esta sección se presenta la actividad antioxidante realizada, mediante la inhibición del radical DPPH, para los extractos de alfalfa con un periodo de 9 días de crecimiento, tratados con TiO₂ y Ag-TiO₂ sintetizado a partir de la técnica sol gel. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11

Actividad estabilizadora de radical DPPH^{•+} en germinados de alfalfa tratados con TiO₂.

Tratamiento	Concentración (ppm)	% de IHB [†]
Control	0	48.62 ± 2.82 ^A
	1	28.30 ± 3.52 ^{C*}
TiO ₂	5	40.85 ± 2.82 ^{B*}
	10	17.72 ± 1.43 ^{D*}
	15	13.96 ± 1.20 ^{D*}

* Porcentaje de inhibición de radical DPPH⁺, registrado entre los extractos de los germinados afectados por las distintas concentraciones de TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores porcentuales representan la capacidad reductora de cada muestra de inhibir la actividad oxidante del radical DPPH⁺. † (Porcentaje de inhibición). Los promedios con letras distintas indican diferencias según la prueba de Tuckey (p < 0.05), los asteriscos indican diferencias respecto al control, según la prueba de Dunnett (p < 0.05).

Los efectos observados cuando se utilizó TiO₂ (Tabla 11) mostraron una reducción en la capacidad antioxidante de la muestra, pues en todos los casos el porcentaje de inhibición se redujo alcanzando su máximo punto en las 15 ppm; es decir, que la diferencia porcentual promedio respecto a lo observado en el grupo de control ascendió a un 70 %. Así mismo, se observó que la concentración de 5 ppm produjo un efecto similar al grupo de control, sin embargo, fue lo suficientemente significativa (p < 0.05) esta diferencia como para representar una baja capacidad de eliminación de radicales libres, por lo que estos resultados indican que las concentraciones probadas de TiO₂ en general promovieron un descenso importante en la forma que los mecanismos de protección oxidante actúan sobre las especies reactivas de oxígeno.

Tabla 12

Actividad estabilizadora de radical DPPH⁺ en germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO₂.

Tratamiento	Concentración (ppm)	% de IHB [†]
Control	0	57.40 ± 1.93 ^{AB}
	1	54.00 ± 1.72 ^{AB}
Ag-TiO ₂	5	49.97 ± 3.53 ^B
	10	49.17 ± 5.66 ^B
	15	60.45 ± 3.49 ^A

* Porcentaje de inhibición de radical DPPH⁺, registrado entre los extractos de los germinados afectados por las distintas concentraciones de Ag-TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores porcentuales representan la capacidad reductora de cada muestra de inhibir la actividad oxidante del radical DPPH⁺. † (Porcentaje de inhibición). Los promedios con letras distintas indican diferencias según la prueba de Tuckey (p < 0.05), los asteriscos indican diferencias respecto al control, según la prueba de Dunnett (p < 0.05).

En cuanto al tratamiento con Ag-TiO₂ (Tabla 12), los efectos observados en general mostraron un comportamiento ligeramente distinto al exhibido por el control. El porcentaje de inhibición se mantuvo en un rango similar para las concentraciones: 1 ppm (54 %), 5 ppm (50 %) y 10 ppm (49 %), mientras que para las 15 ppm (60 %) se manifestó una promoción discreta de apenas un 5 % respecto al control, sin ser esta significativa. Es importante señalar que las variaciones en cuanto al daño oxidativo no fueron significativas entre las concentraciones probadas ($p > 0.05$), ninguna de ellas provocó efectos notorios sobre la capacidad de neutralizar radicales libres. No existe una tendencia clara en cuanto a que concentración generó el comportamiento con mayor daño oxidativo, ya que las fluctuaciones no fueron lo suficientemente robustas como para promover una tendencia.

8.2.5 Actividad estabilizadora de radical ABTS^{•+} en germinados tratados con TiO₂ y Ag-TiO₂.

Esta sección se presenta la actividad antioxidante realizada mediante la inhibición del radical ABTS^{•+}, para los extractos de alfalfa con un periodo de 9 días de crecimiento, tratados con TiO₂ y Ag-TiO₂ sintetizado a partir de la técnica sol-gel. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13

Actividad estabilizadora de radical ABTS^{•+} en germinados de alfalfa tratados con TiO₂.

Tratamiento	Concentración (ppm)	% de IHB [†]
Control	0	70.36 ± 1.42 ^A
	1	67.49 ± 1.04 ^{AB}
	5	68.52 ± 2.76 ^{AB}
	10	62.78 ± 2.97 ^{BC*}
	15	55.65 ± 4.13 ^{C*}

* Porcentaje de inhibición de radical ABTS^{•+}, registrado entre los extractos de los germinados afectados por las distintas concentraciones de TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores porcentuales representan la capacidad reductora de cada muestra de inhibir la actividad oxidante del radical ABTS^{•+}. † (Porcentaje de inhibición). Los promedios con letras distintas indican diferencias según la prueba

de Tuckey ($p < 0.05$), los asteriscos indican diferencias respecto al control, según la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Para el primer tratamiento con TiO_2 (Tabla 13), se observó un comportamiento inhibitorio en la capacidad antioxidante en todas las concentraciones probadas. El comportamiento exhibido por las concentraciones 1 y 5 ppm, demostró tener efectos similares, sin una diferencia significativa respecto a lo observado con el grupo de control ($p > 0.05$); por otro lado, las concentraciones de 10 y 15 ppm si exhibieron un comportamiento ligeramente inhibitorio, teniendo una diferencia significativa en comparación con el control ($p < 0.05$), no obstante la capacidad antioxidante entre estas dos concentraciones no condujo a una respuesta notablemente distinta, a pesar de que su diferencia porcentual observada se encuentre entre un 8 y 15 %, respecto al grupo de control. Al mismo tiempo es importante señalar que la concentración con menor capacidad para brindar protección al daño oxidativo fue la 15 ppm, induciendo como se mencionó anteriormente, una baja capacidad para eliminar radicales libres. En resumen, las concentraciones de 10 y 15 ppm promovieron una baja capacidad de eliminación de radicales libres, mientras que las de 1 y 5 ppm no provocaron cambios notables en la habilidad de estabilizar radicales en comparación con el control.

Por otro lado, en el segundo tratamiento con Ag-TiO_2 (Tabla 14) se observó un comportamiento más evidente en cuanto a qué concentraciones generaron una respuesta promotora y cuales fueron inhibitorias. A continuación, se muestran estos valores expresados en porcentaje de inhibición.

Tabla 14Actividad estabilizadora de radical ABTS^{•+} en germinados de alfalfa tratados con Ag-TiO₂.

Tratamiento	Concentración (ppm)	% de IHB [†]
Control	0	56.09 ± 3.48 ^B
	1	64.12 ± 2.99 ^{A*}
Ag-TiO ₂	5	65.35 ± 2.47 ^{A*}
	10	46.78 ± 1.66 ^{C*}
	15	48.41 ± 0.62 ^{C*}

* Porcentaje de inhibición de radical ABTS^{•+}, registrado entre los extractos de los germinados afectados por las distintas concentraciones de Ag-TiO₂ y el grupo de control después de 9 días de crecimiento. Los valores porcentuales representan la capacidad reductora de cada muestra de inhibir la actividad oxidante del radical ABTS^{•+}. † (Porcentaje de inhibición). Los promedios con letras distintas indican diferencias según la prueba de Tuckey ($p < 0.05$), los asteriscos indican diferencias respecto al control, según la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Como se muestra en la Tabla 14, se registró un comportamiento interesante a la capacidad antioxidante de las concentraciones evaluadas. En principio las concentraciones de 1 y 5 ppm indujeron una promoción ($p < 0.05$) en la eliminación de radicales ABTS en una proporción del 8 y 9 % respectivamente, en comparación con lo observado en el grupo de control. Esto contrastó con las concentraciones de 10 y 15 ppm cuyo efecto fue más bien inhibitorio, es decir que redujo la capacidad de eliminar el radical de prueba en una proporción del 9 y 8 % respectivamente, respecto al control. Este comportamiento resulta especialmente interesante ya que las concentraciones extremo (1 y 15 ppm), resultaron en una diferencia proporcional respecto al control, así como el comportamiento generado por las concentraciones de 5 y 10 ppm alrededor del control. Adicional a lo anteriormente mencionado, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para la prueba de Dunnett. En cuanto a la diferencia entre los tratamientos, también fue significativa ($p < 0.05$) para Tukey.

En aquellas concentraciones con efectos similares, no se observó una significancia estadística según la prueba de Tukey; en otras palabras, las concentraciones que mostraron tener efectos promotores, no presentaron una diferencia significativa, así

mismo, la diferencia estadística para las concentraciones inhibitorias no presentó una $p > 0.05$, por lo que, en esencia fueron similares.

9.0 Actividad de las enzimas Super óxido dismutasa (SOD), Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) y Catalasa (CAT).

Con el propósito de evaluar la incidencia de las NPs sobre los germinados, como el cambio en los niveles enzimáticos debido a los tratamientos con TiO_2 y Ag-TiO_2 , se realizaron dos pruebas estadísticas (prueba de Dunnett y Tuckey, $p < 0.05$), comparando las concentraciones de los tratamientos con el grupo de control, así como todos los pares promedio. Dichos resultados se resumen en la Tabla 15. De manera general, con el primer tratamiento con TiO_2 se observó una disminución aparente del índice de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD), adicionalmente esta reducción fue estadísticamente significativa, lo que indica un cambio sustancial sobre la actividad de la enzima correspondiente al grupo de control y las concentraciones probadas. En tanto que el porcentaje de disminución ascendió al 80 %, se puede señalar que las concentraciones de 1 y 5 ppm promovieron una reducción significativa respecto a lo que se observó en las demás concentraciones. De manera similar, el tratamiento con Ag-TiO_2 generó un efecto reductor en la actividad SOD, como se mencionó con anterioridad, siendo solo la concentración de 15 ppm la que parece no tener un efecto sobre la enzima y permaneciendo similar al control sin diferencias significativas.

A continuación, se presentan los resultados registrados para la fenilalanina amonio liasa (PAL) en los germinados tratados con NPs de TiO_2 y Ag-TiO_2 . El tratamiento con TiO_2 , provocó un aumento porcentual apenas del 25 % sobre la actividad registrada en el grupo de control, así mismo, aunque las demás concentraciones promovieron cambios porcentuales, ninguna de ellas fue significativa. Adicionalmente, estos cambios a pesar de ser discretos parecen indicar una tendencia sutil de incremento, alcanzando el máximo en las 15 ppm. En un segundo escenario, el tratamiento con Ag-TiO_2 tampoco generó un incremento o inhibición significativo en la actividad PAL respecto al grupo de control, no obstante, aunque estos cambios fueron discretos, se presentó un coincidente incremento porcentual

(con el primer tratamiento) cuando se usaron 15 ppm. La actividad se elevó por encima de la observada en el grupo de control y las demás concentraciones. A diferencia de la SOD, en donde la actividad fue casi nula, la enzima PAL si registró actividad en todos los casos, aun cuando estas no fueron estadísticamente relevantes.

Finalmente, la actividad registrada para la enzima Catalasa (CAT) cuando se usó TiO₂ mostró tener un efecto significativo de inhibición cuando se usó 1 ppm, no así con las demás concentraciones en donde el incremento porcentual máximo fue del 13 %. Al igual que la SOD, la actividad de esta enzima se vio disminuida casi por completo en todos los casos, pues los valores estuvieron muy cercanos a cero. En un segundo escenario, el tratamiento con Ag-TiO₂, generó una respuesta inhibitoria coincidente con el primer tratamiento, cuando se usó de 1 ppm. Se registró un descenso del 34 % en la actividad de la enzima respecto al grupo de control. En resumen, las concentraciones de 15 y 1 ppm presentaron comportamientos coincidentes en ambos tratamientos, para las enzimas PAL y CAT. En el caso de la SOD, no existió un comportamiento coincidente más allá del descenso en la actividad de la enzima, aunque en distintas concentraciones. TiO₂ encontró su punto máximo de inhibición con las 5 ppm, mientras que Ag-TiO₂, en 10 ppm, ambas en un rango de 80 - 87 %. Adicionalmente es de notar que solo la enzima PAL registró una actividad mayor a cero, mientras que la actividad de SOD y CAT se registró con valores muy cercanos a cero.

Tabla 15

Actividad enzimática en germinados tratados con NPs de TiO₂ y Ag-TiO₂.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Act. SOD (U/mg proteína)	%	Act. PAL (U/mg proteína)	%	Act. CAT (U/mg proteína)	%
	Control	0.130 ± 0.008 ^A	100	6.253 ± 1.603 ^A	100	0.177 ± 0.014 ^A	100
TiO ₂	1	0.018 ± 0.002 ^{B*}	-86.0	6.211 ± 0.316 ^A	-0.7	0.137 ± 0.015 ^{B*}	-22.4
	5	0.016 ± 0.002 ^{B*}	-87.0	6.738 ± 0.530 ^A	+7.8	0.177 ± 0.014 ^A	+0.4
	10	0.037 ± 0.027 ^{B*}	-71.0	6.995 ± 2.292 ^A	+11.9	0.182 ± 0.012 ^A	+3.3
	15	0.031 ± 0.005 ^{B*}	-75.7	7.872 ± 1.111 ^A	+25.9	0.2 ± 0.010 ^A	+13

	1	$0.053 \pm 0.008^{\text{B}}$ C^*	-59.1	$5.92 \pm 0.91^{\text{A}}$	-5.3	$0.117 \pm 0.017^{\text{B}*}$	-33.9
Ag-TiO ₂	5	$0.072 \pm 0.027^{\text{B}*}$	-45.0	$5.614 \pm 1.37^{\text{A}}$	-10.2	$0.215 \pm 0.001^{\text{A}}$	+21.4
	10	$0.025 \pm 0.002^{\text{C}*}$	-80.4	$6.601 \pm 2.633^{\text{A}}$	+5.6	$0.214 \pm 0.023^{\text{A}}$	+21.1
	15	$0.139 \pm 0.015^{\text{A}}$	+6.6	$7.793 \pm 2.66^{\text{A}}$	+24.6	$0.162 \pm 0.033^{\text{A,B}}$	-8.1

*Actividad enzimática presentada en germinados de 9 días de crecimiento. Los promedios con letra distinta representan diferencias estadísticamente significativas respecto al control, según la prueba de Tuckey ($p < 0.05$). Los promedios con * indican diferencias significativas respecto al control, según la prueba de Dunnett. La columna de porcentaje (%) representa el incremento o inhibición respecto al grupo de control.

8. DISCUSIÓN.

Los resultados observados en los germinados tratados con las soluciones de TiO₂ y Ag-TiO₂ exhibieron cambios morfológicos que pueden atribuirse a las características del mismo ensayo, destacan el tiempo de exposición, el tamaño de partícula y las concentraciones empleadas en cada caso, así como el dopante. Estos cambios morfológicos indicaron que, la adición de nanopartículas en el proceso germinativo repercutió, en la posterior etapa de emergencia radicular pero no así en la cantidad de peso fresco. Las semillas que recibieron un efecto promotor sobre las características morfológicas con el tratamiento de TiO₂ fueron las que se encontraban expuestas a la dosis más baja del tratamiento (1 ppm). Al menos, cuatro de los seis parámetros (longitud de radícula, largo y ancho de hoja y la pigmentación de las hojas) resultaron modificados a la misma concentración. Por otro lado, el tratamiento con Ag-TiO₂ (15 ppm) mostró cambios morfológicos significativos en: % de germinación, peso fresco y longitud de radícula, mientras que en la morfología de las hojas no se registraron cambios significativos, con respecto al grupo de control.

La diferencia entre el peso fresco del control y de los germinados tratados con las NPs de TiO₂ y Ag-TiO₂, puede atribuirse al tiempo de exposición de las semillas durante la imbibición, ya que es posible, que las semillas lograran absorber la cantidad de agua necesaria para afectar la fase uno y dos del proceso germinativo,

puesto que son estas etapas en las que existe mayor movilización de la reserva energética, lo que en consecuencia podría repercutir en la producción de biomasa. El peso fresco registrado, exhibió un comportamiento similar a lo reportado por (Hao et al., 2016), donde evaluaron el uso de distintas nanopartículas, incluyendo TiO₂ en germinados de arroz, con un tiempo de imbibición similar. Se observaron efectos sobre producción de biomasa similares para las concentraciones de 10 y 5 ppm, en donde no existió diferencia significativa respecto al control. Adicionalmente ninguna de las concentraciones (5, 10, 30, 50, 100, 150 ppm) provocaron cambios significativos sobre la biomasa, lo que concuerda con lo observado en este estudio.

Por otro lado, el porcentaje de germinación y la longitud de radícula no guardaron relación directa con el peso fresco (Figura 13 y 14). El porcentaje de germinación fue afectado ($p > 0.05$) por las concentraciones de 10 y 5 ppm disminuyendo la cantidad de semillas germinadas respecto a las sembradas, esto mismo se reporta (Basahi, 2021), donde una concentración de 50 mg/L de TiO₂ disminuyó la tasa de germinación en un 16 % sobre germinados de chícharo. Adicionalmente, (Haghighi & Teixeira Da Silva, 2014; Hao et al., 2016) reportaron que la longitud de los germinados no estuvo directamente relacionada con el peso fresco, ya que, a pesar de que las concentraciones de 5 y 10 ppm aumentaron la longitud de la radícula, este incremento no se reflejó en la biomasa. Esto sugiere que, los germinados con promoción radicular no necesariamente incrementan proporcionalmente su biomasa.

Por otro lado (Kushwah & Patel, 2020; School of Studies in Botany, Jiwaji University, Gwalior-474011, Madhya Pradesh, India et al., 2020) reportaron comportamientos inhibitorios en *Vicia faba L* y *P. Vulgaris* para 15 mg/L de TiO₂ en donde la longitud de los brotes se vio afectada particularmente por esta concentración en períodos de crecimientos de 20 y 7 días, respectivamente. Esto, es proporcional con la tendencia observada en la misma concentración usada en este estudio y sugiere que dicha concentración tiene un efecto inhibitorio en el desarrollo de las radículas. En ambos estudios se usaron NPs con un tamaño aproximado de 83 nm, mientras que, en este ensayo fue de 20 (TiO₂) y 14 (Ag-TiO₂) nm aproximadamente. En contradicción, el tiempo de exposición de las semillas y el tiempo de germinación, no fueron

determinantes en el resultado inhibitorio o promotor, específicamente con la concentración de 15 ppm.

De la misma forma, el segundo tratamiento con Ag-TiO₂ provocó cambios morfológicos en la promoción de raíz congruentes con lo reportado por (Vannini et al., 2013), en donde se usaron NPs de Ag y AgNO₃ como agentes promotores de crecimiento. Se observó que el tratamiento con Ag-NP promovió el crecimiento de raíces expuestas a concentraciones de 10 y 20 mg/L, no obstante, el tratamiento con NPs de AgNO₃ inhibió el crecimiento de raíz por completo a partir de 20 mg/L tras 5 días de exposición. Estos efectos, son atribuidos a la liberación de iones Ag⁺ pudiendo estar afectando la acumulación de proteínas involucradas en el metabolismo del azufre. Estas proteínas (jacalinas) al poseer una capacidad para catalizar la hidrólisis de metabolitos secundarios con azufre en su estructura, liberan nitrilo y sulfato al medio. El nitrilo posee actividad auxínica y puede convertirse en ácido indol-3 acético, lo que puede explicar parcialmente la estimulación radicular en germinados con presencia de AgNP.

Adicionalmente, los resultados observados sobre las hojas (en este caso correspondientes a la pigmentación) expresados en unidades SPAD exhibieron una promoción en el contenido de clorofila cuando se usó TiO₂. Para este primer tratamiento, las concentraciones de 1 y 5 ppm promovieron significativamente el color de las hojas en un 17 % respecto al control, lo que es contradictorio con lo reportado por (Doğaroğlu, 2017), donde usaron algunas concentraciones (5, 10, 20, 40, 80 mg/kg) similares. En general, todas estas concentraciones inhibieron la pigmentación respecto al control, sin embargo, destacan 5 y 10 mg/kg ya que coinciden proporcionalmente, con las concentraciones empleadas en el presente estudio.

En un escenario contrario, el uso de NP dopadas (Ag-TiO₂) no generó cambios significativos sobre los valores SPAD para las concentraciones evaluadas. Esto contrasta lo reportado por (Gordillo-Delgado et al., 2020), donde el uso de NPs de Ag-TiO₂ de tamaño reducido (7-8 nm) y en concentraciones bajas (2 %) en semillas de espinaca, llegó a generar efectos positivos sobre la actividad fotosintética, misma

que se vio incrementada en un 21.78 %; así mismo los parámetros de crecimiento como altura de las plántulas, dimensiones de las hojas y número de hojas, aumentaron entre un 30 y el 49 %, respecto al control. Ellos sugieren que los resultados observados sobre la actividad fotosintética se debe a la generación de especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo, efectos genotóxicos, inhibición de generación de enzimas, así como disminución de viabilidad celular (Cox et al., 2017b), sin embargo advierten que es importante tener en cuenta el tamaño y concentración de la NP. Esto debido a que NPs de mayor tamaño y concentración, pueden llegar a promover acumulación en las raíces, afectando negativamente la morfología.

Teniendo en cuenta esto proponen que, para obtener mejores resultados, el metabolismo de la planta no debe ser alterado de forma drástica, ya que el de Ag-TiO₂ al mejorar el crecimiento y la formación de clorofila, también aumenta la actividad Rubisco, así como la tasa fotosintética durante la etapa de crecimiento, no obstante el efecto es inversamente proporcional al tamaño de partícula y la concentración, de esta forma las ROS incrementan su concentración provocando daños estructurales sobre la membrana lipídica inhibiendo la capacidad fotosintética (Jhazab et al., 2015; Larue et al., 2014). Esta puede ser una razón por la que los niveles de las unidades SPAD, no hayan variado demasiado respecto al control, ya que, si tomamos en cuenta el tamaño de partícula empleado en este ensayo, concluimos que es al menos 2 veces mayor que el antes mencionado, esto sugiere que el tamaño de las NP juega un papel importante en la modificación del contenido de clorofila.

Por lo anterior es importante mencionar que existen al menos, tres mecanismos de internalización, propuestos por (Behzadi et al., 2017), el primero de ellos involucra directamente la difusión de la nanopartícula a través de la membrana plasmática, el segundo, sugiere la fagocitación de la NP por parte de la célula y el tercero, alude a un transporte mediante proteínas o canales transmembranales. Esto es especialmente importante, debido a que el tamaño de NP empleado en el ensayo es relativamente pequeño y podría haberse internalizado mediante cualquiera de estos mecanismos al espacio intracelular mediante difusión o gracias a los canales

de la membrana plasmática. En consecuencia, podría haber incidido directamente en el proceso metabólico de la germinación, especialmente en la fase II, generando estrés sobre la actividad de los sistemas antioxidantes como metabolitos secundarios y enzimas como la catalasa y super óxido dismutasa. Sin embargo, dichos efectos no fueron completamente concluyentes en todos los casos.

En lo que se refiere al perfil metabólico se observó que, en ambos casos el uso de NPs en el proceso germinativo produjo efectos promotores para la mayoría de las concentraciones probadas. Cuando se usó TiO_2 sin dopar, se generó una tendencia dosis-respuesta más evidente que cuando se usó plata como dopante. Para el primer tratamiento (TiO_2) se generó un comportamiento proporcional a la concentración, alcanzando el máximo efecto promotor en las 15 ppm. Esto coincide con lo reportado por (Missaoui et al., 2021) en donde observaron resultados promotores en los niveles de polifenoles (17-56 %) en *Fenugreek* usando TiO_2 en concentraciones de 50 mgL^{-1} y 100 mgL^{-1} , ellos proponen que este efecto promotor en los niveles de polifenoles, pueden deberse al tamaño de la NPs, ($83 \pm 15 \text{ nm}$). Otro estudio conducido por (Tighe-Neira et al., 2020) en donde se usó TiO_2 (86nm) en un rango 10 a 1500 mgL^{-1} en *Raphanus sativus* L. se encontró que la concentración de 10 mgL^{-1} incrementaba significativamente los niveles de fenoles totales en plantas de 25 días de edad. Esto concuerda con los resultados observados en la promoción de contenido fenólico.

Por otro lado, para el segundo tratamiento con NPs dopadas, se alcanzó el punto de máxima incidencia con 5 ppm, sin que se presentara una tendencia de crecimiento evidente, como la observada en el primer tratamiento. Por ejemplo; esta misma concentración generó un efecto distinto en función del dopaje. Cuando se usó Ag-TiO_2 la producción de fenoles totales se disparó en poco más del doble, respecto al control.

El perfil antioxidante evaluado mediante la técnica de neutralización del radical DPPH, arrojó en su mayoría resultados inhibitorios para todas las concentraciones evaluadas, lo que contrasta con lo reportado por (García-López et al., 2018b) en donde probaron nanopartículas de óxido de Zinc en germinados de pimiento

Capsicum annuum L., en concentraciones de 0, 100, 200 y 500 ppm. Se observó que, en las radículas expuestas a estas NPs, se produjo un incremento discreto en la actividad antioxidante alcanzando su máximo punto promotor en la concentración de 500 ppm. De acuerdo con (Jiang et al., 2017), óxidos metálicos como ZnO, CuO y CeO así como NPs de plata, tiene la capacidad de generar estrés oxidativo una vez que se encuentran internalizadas en la célula, liberando iones tóxicos al medio intracelular; lo que directamente activa respuestas antioxidantes por parte del sistema entero. Un ejemplo de esto, son las AgNPs, las cuales desencadenan la señalización Ca^{2+} y ROS a través de la inducción de poros permeables al Ca^{2+} y la oxidación directa del ácido L-ascórbico apoplástico (vitamina C) (Sosan et al., 2016), siendo este último un antioxidante no enzimático importante en plantas, y que participa en la defensa contra el estrés oxidativo degradando H_2O_2 .

Este comportamiento con el tratamiento sin dopaje (TiO_2) así como el dopado (Ag- TiO_2), sugiere una respuesta inhibitoria en la capacidad que tiene la muestra de neutralizar el daño oxidativo. En tal caso, aquel tratamiento con menor capacidad de producir electrones libres al medio (TiO_2) mediante actividad fotocatalítica fue el que presentó mayor reducción en actividad antioxidante, o dicho de otra forma propició la generación de ROS. Esto resulta especialmente interesante debido a que el segundo tratamiento (Ag- TiO_2), al contar con una capacidad fotocatalítica más elevada debido al dopante, no aumentó de manera significativa en la capacidad antioxidante, en ninguno de los casos esta diferencia constitutiva significó un efecto significativo en la habilidad neutralizadora de radicales. No obstante, se necesita contar con un rango de concentraciones más amplio para comprobar si concentraciones más altas a 15 ppm reducen el estrés oxidativo.

Dichos resultados pueden estar relacionados también con la poca presencia del dopante (Ag^+) en el TiO_2 de acuerdo con los resultados observados en la caracterización de las NPs mediante Raman (Figura 11). Basados en estos resultados, es lógico pensar que los niveles de actividad antioxidante estén reflejando lo observado en los sistemas de defensa antioxidantes como son los polifenoles (fenoles totales y flavonoides totales), aplicando TiO_2 y Ag- TiO_2 . Ya que el tratamiento sin dopante mostró resultados con mayor promoción que los

observados en el tratamiento con el dopante (Tablas 12 y 13) (Figuras 22 y 23).

De acuerdo con (Mahakham et al., 2017), los mecanismos por los cuales actúan los tratamientos de “*seed priming*” basados en NPs de plata son 3: (i) Creación de nanoporos en la cubierta de la semilla, (ii) Agente generador de ROS y (iii) nanocatalizador para potenciar la actividad de la enzima degradadora del almidón (α -amilasa). Esto mismo concuerda con algunas propuestas descritas anteriormente por (Behzadi et al., 2017). Se propone, que una vez las nanopartículas de Ag han degradado la pared celular, comienza una rápida absorción de agua hacia el interior de la semilla, provocando la sobre expresión de acuaporinas (mismas que fungen de manera natural como canales de difusión de agua), induciendo al mismo tiempo una alta acumulación de ROS (H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$). Esto es especialmente importante ya que se hipotetiza que la presencia de las ROS es importante en una justa medida para que la germinación se lleve a cabo. No obstante, la presencia excesiva puede llegar a afectar este proceso.

De esta forma se piensa que la baja presencia de iones Ag^+ en el medio, no es lo suficientemente elevada como para alterar de forma negativa el proceso germinativo. Esto puede constatarse en los niveles de fenoles totales, pues casi no cambiaron respecto al control, así como los flavonoides. De igual manera, la actividad estabilizadora del radical DPPH fue similar al control. (Bedlovičová et al., 2020) menciona que la presencia de NP de plata, puede llegar a alterar la determinación de actividad antioxidante en algunos casos por lo que, el análisis realizado por ABTS puede diferir en la tendencia observada anteriormente, adicionalmente, el análisis ABTS está basado en un mecanismo de intercambio de electrones SAT (Single Atom transfer, por sus siglas en inglés) y no necesariamente presenta una coincidencia con el método DPPH.

Finalmente, se señala que ambos tratamientos tienen un efecto sobre la capacidad que tiene el germinado de contrarrestar el daño oxidativo. En un primer escenario, el tratamiento sin dopaje (TiO_2) generó una respuesta inhibitoria en la capacidad de reducir las ROS, lo que se puede traducir como un aumento de radicales libres. Por otro lado, el tratamiento con dopaje ($Ag-TiO_2$) propició la generación de una

respuesta dividida, cuando se usan concentraciones de 1 y 5 ppm, el efecto parece aproximarse a una protección contra el daño generado por las ROS, pues tal como los resultados muestran hay una promoción en su capacidad antioxidante. Sin embargo, una vez que la concentración aumenta a 10 y 15 ppm esta capacidad se ve mermada y en consecuencia se observa un aumento en las ROS, mismo que genera estrés oxidativo.

Los resultados correspondientes al perfil enzimático, no se consideran concluyentes debido a que los niveles reportados de Catalasa y Super Óxido Dismutasa fueron muy cercanos a cero, lo que indica una pobre actividad enzimática. No obstante, esto podría deberse a que, en el momento del análisis, probablemente dichas enzimas hubieran terminado de degradar los principales radicales libres. La actividad SOD pudo haber terminado de degradar el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a H_2O_2 mientras que la Catalasa presumiblemente pudo haber degradado H_2O_2 a moléculas más pequeñas como H_2O (Shah et al., 2021).

En el presente estudio, ninguno de los dos tratamientos, promovió de manera sustancial los niveles de SOD y CAT, de forma similar, los resultados observados en la enzima PAL no fueron significativamente distintos respecto al control. Esto es especialmente interesante, ya que en diversos estudios se ha reportado que el uso de TiO_2 nanoparticulado como agente promotor de crecimiento ha demostrado tener una injerencia directa en enzimas regulares de estrés oxidativo.

9. CONCLUSIONES.

Los parámetros afectados por ambos tratamientos, parecen guardar una dependencia con el tamaño de la nanopartícula, el cual ronda los 20 nm para el TiO_2 y 14 nm para $Ag-TiO_2$, así como con el tiempo de exposición y de la especie empleada en este ensayo, ya que la composición de la testa puede llegar a jugar un papel importante en la forma que las NPs interactúan con las semillas.

El tamaño de las NP empleadas es de suma importancia, ya que entre más pequeñas sean, mayor penetración habrá propiciado una mejor movilización en la

planta; en cambio si el tamaño de la partícula es de mayor tamaño podrían quedar atrapadas en las raíces. Esto afectaría el crecimiento y actividad fotosintética, desembocando en efectos negativos sobre la morfología

El uso de TiO_2 también generó cambios morfológicos significativos respecto a aquellos germinados que no fueron tratados. En el caso del tamaño de las hojas, las concentraciones de 1 y 15 ppm afectaron de manera significativa el desarrollo de las hojas, haciéndolas más pequeñas que el control. Por otro lado, la promoción de crecimiento fue discreto en general cuando se usó la concentración de 5 ppm. Es lógico pensar que el tamaño de las hojas, pudo haber influir en la capacidad que tiene la plántula de captar luz solar y en consecuencia reflejarse en la pigmentación de las hojas.

10. PERSPECTIVAS.

La presencia de NPs como agentes promotores de crecimiento en organismos como las plantas, generan distintos efectos dependientes de las concentraciones empleadas, así como varias características propias de cada nanopartícula, por mencionar algunas.

Por lo que para tener un mejor conocimiento de cómo el uso de estos materiales está afectando el crecimiento de las plantas, así como los procesos germinativos, se propone realizar estudios histológicos con los cuales constatar la presencia y traslocación de las NPs en el organismo. Así mismo, aumentar el rango de concentraciones con la final de observar cómo cambian los efectos a medida que estas aumentan en un intervalo amplio. Por otro lado, existen metodologías que llamaron mi atención al estar realizando esta investigación y que podrían brindar información importante acerca de cómo los radicales libres afectan el desarrollo germinativo. Por ejemplo, la Resonancia Electrónica de Spin e imagenología fluorescente, estos análisis brindan información valiosa sobre la aparición y localización de especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 y O_2^{\bullet} .

Finalmente, es importante contar con un ambiente que propicie el correcto desarrollo germinativo, así como el crecimiento, de tal forma se sugiere continuar mejorando la metodología empleada para dicho proceso.

11.REFERENCIAS

- Abiotic and Biotic Stress*. (2020). 545–589. <https://doi.org/10.1017/9781108486392.021>
- ACS Select on Nanotechnology in Food and Agriculture: A Perspective on Implications and Applications. (2014). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1209–1212. <https://doi.org/10.1021/jf5002588>
- Ahmed, M., Khatun, F., & Islam, Z. (2021). Effects of Osmotic, Thermal and Plant Growth Regulators Seed Priming on Different Wheat Varieties. *Journal of Bio-Science*. <https://doi.org/10.3329/jbs.v29i2.54960>
- Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P. B., Banadka, A., Sudheer, W. N., Nagella, P., Shehata, W. F., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A.-S. (2023). Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. *Metabolites*, 13(6), 716. <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>
- Almaraz Abarca, N., Ávila Reyes, J. A., Delgado Alvarado, E. A., Naranjo Jiménez, N., & Herrera Corral, J. (2006). *El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto*.
- Al-Namazi, A. A., Al-Ammari, B. S., Davy, A. J., & Al-Turki, T. A. (2020). Seed dormancy and germination in *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) from south-western Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9), 2420–2424. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.036>
- Ameta, R. A., Suresh C. (2016). *Photocatalysis: Principles and Applications*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315372396>
- ARUNA, A., NAMASIVAYAM, S. K. R., & CHANDU, P. S. (2014). EVALUATION OF PHYTOTOXICITY OF METALLIC NANOPARTICLES AGAINST AMARANTHUS RETROFLEXUS. *ASIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY*,

BIOTECHNOLOGY AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, 16(2), 279–284.

Ashfaq, M., Verma, N., & Khan, S. (2017). Carbon nanofibers as a micronutrient carrier in plants: Efficient translocation and controlled release of Cu nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 4(1), 138–148.

<https://doi.org/10.1039/C6EN00385K>

Association, I. S. T. (s/f). *International Rules for Seed Testing*. International Seed Testing Association. Recuperado el 31 de agosto de 2023, de <https://www.seedtest.org/en/publications/international-rules-seed-testing.html>

Barrón-Yáñez, M. R., Villanueva-Verduzco, C., García-Mateos, M. R., & Colinas-León, M. T. (2009a). Valor nutritivo y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), canola (*Brassica napus* L.) y amaranto (*Amaranthus leucocarpus* S. Watson syn.

Hypoch. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(3), Article 3.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1027-

[152X2009000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1027-152X2009000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Barrón-Yáñez, M. R., Villanueva-Verduzco, C., García-Mateos, M. R., & Colinas-León, M. T. (2009b). Valor nutritivo y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), canola (*Brassica napus* L.) y amaranto (*Amaranthus leucocarpus* S. Watson syn.

Hypoch. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(3), 237–243.

Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., & Arora, S. (2013). Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 216–232. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9272-x>

Basahi, M. (2021). Seed germination with titanium dioxide nanoparticles enhances water supply, reserve mobilization, oxidative stress and antioxidant enzyme activities in pea. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(11), 6500–6507. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.023>

Bayat, M., Zargar, M., Murtazova, K. M.-S., Nakhaev, M. R., & Shkurkin, S. I. (2022). Ameliorating Seed

- Germination and Seedling Growth of Nano-Primed Wheat and Flax Seeds Using Seven Biogenic Metal-Based Nanoparticles. *Agronomy*, 12(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040811>
- Bedlovičová, Z., Strapáč, I., Baláž, M., & Salayová, A. (2020). A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. *Molecules*, 25(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules25143191>
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>
- Belay, T., Worku, L. A., Bachheti, R. K., Bachheti, A., & Husen, A. (2023). Nanomaterials: Introduction, synthesis, characterization, and applications. En *Advances in Smart Nanomaterials and their Applications* (pp. 1–21). Elsevier.
- Bhushan, B. (2017). Introduction to Nanotechnology. En B. Bhushan (Ed.), *Springer Handbook of Nanotechnology* (pp. 1–19). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3_1
- Borsato, E., Tarolli, P., & Marinello, F. (2018). Sustainable patterns of main agricultural products combining different footprint parameters. *Journal of Cleaner Production*, 179, 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.044>
- Carbon-Based Nanomaterials. (2016). En *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology* (pp. 189–236). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119096122.ch5>
- Carrillo, N., & Valle, E. (2023). *El Lado Oscuro del Oxígeno*.
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.
- Coba, P., Tivi, L. M., & Vidari, G. (2010). Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. *La granja*, 11(1), 22–30.
- Colman, B. P., Arnaout, C. L., Anciaux, S., Gunsch, C. K., Hochella, M. F., Kim, B., Lowry, G. V., McGill, B. M.,

- Reinsch, B. C., Richardson, C. J., Unrine, J. M., Wright, J. P., Yin, L., & Bernhardt, E. S. (2013). Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario. *PLoS One*, *8*(2), e57189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057189>
- Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., & Sharma, N. (2017a). Reprint of: Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, *110*, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.007>
- Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., & Sharma, N. (2017b). Reprint of: Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, *110*, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.007>
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A.-M., Vrčec, I. V., Tolić, S., Štefanić, P. P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., & Balen, B. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and environmental safety*, *137*, 18–28. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651316304638>
- CyD. (s/f). Recuperado el 14 de julio de 2023, de <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=227>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Doğaroğlu, Z. (2017). Effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on germination and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, *15*(3), 1499–1510. https://doi.org/10.15666/aeer/1503_14991510
- Dong, Q., Wallrad, L., Almutairi, B. O., & Kudla, J. (2022). Ca²⁺ signaling in plant responses to abiotic stresses.

- Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 287–300. <https://doi.org/10.1111/jipb.13228>
- Doria, J. (2010). *Revisión bibliográfica GENERALIDADES SOBRE LAS SEMILLAS: SU PRODUCCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO*. 31, 74–85.
- Ea, I. (2016). Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. *Journal of Plant Physiology*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.12.011>
- Elamawi, R. M. A., & El-Shafey, R. A. (2013). INHIBITION EFFECTS OF SILVER NANOPARTICLES AGAINST RICE BLAST DISEASE CAUSED BY MAGNAPORTHE GRISEA. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 91(4), 1271–1283. <https://doi.org/10.21608/ejar.2013.165104>
- Esquivel, K., Nava, R., Zamudio-Méndez, A. R., Vega González, M., Jaime-Acuña, Ó., Escobar-Alarcón, L., Peralta-Hernández, J. M., Pawelec, B., & García Fierro, J. L. (2013). *Microwave-assisted synthesis of (S)Fe/TiO₂ systems: Effects of synthesis conditions and dopant concentration on photoactivity*. <https://doi.org/10.13039/100008989>
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia plantarum*, 100(2), 241–254.
- García-López, J. I., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldívar, R. H., Díaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N. A., Ramos-Cortez, E., Vázquez-Alvarado, R., & Niño-Medina, G. (2018a). Zinc Oxide Nanoparticles Boosts Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Capsicum annuum* L. during Germination. *Agronomy*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100215>
- García-López, J. I., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldívar, R. H., Díaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N. A., Ramos-Cortez, E., Vázquez-Alvarado, R., & Niño-Medina, G. (2018b). Zinc Oxide Nanoparticles Boosts Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Capsicum annuum* L. during Germination. *Agronomy*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100215>
- García-Mier, L., Jiménez-García, S. N., Guevara-González, R. G., Feregrino-Perez, A. A., Contreras-Medina, L. M., & Torres-Pacheco, I. (2015). Elicitor Mixtures Significantly Increase Bioactive Compounds, Antioxidant

- Activity, and Quality Parameters in Sweet Bell Pepper. *Journal of Chemistry*, 2015, e269296.
<https://doi.org/10.1155/2015/269296>
- García-Mier, L., Meneses-Reyes, A. E., Jiménez-García, S. N., Mercado Luna, A., García Trejo, J. F., Contreras-Medina, L. M., & Feregrino-Perez, A. A. (2021). Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Stevia and Peppermint as a Result of Organic and Conventional Fertilization. *Journal of Food Quality*, 2021, e6620446. <https://doi.org/10.1155/2021/6620446>
- Godínez-Mendoza, P. L., Rico-Chávez, A. K., Ferrusquía-Jimenez, N. I., Carbajal-Valenzuela, I. A., Villagómez-Aranda, A. L., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2023). Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. *Science of The Total Environment*, 894, 164883. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164883>
- Gordillo-Delgado, F., Zuluaga-Acosta, J., & Restrepo-Guerrero, G. (2020). Effect of the suspension of Ag-incorporated TiO₂ nanoparticles (Ag-TiO₂ NPs) on certain growth, physiology and phytotoxicity parameters in spinach seedlings. *PLoS ONE*, 15(12), Article 12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244511>
- Guo, Q., Zhou, C., Ma, Z., & Yang, X. (2019). Fundamentals of TiO₂ Photocatalysis: Concepts, Mechanisms, and Challenges. *Advanced Materials*, 31(50), 1901997. <https://doi.org/10.1002/adma.201901997>
- Gutiérrez, B. D. de D. (1983). *Germinados: El alimento más perfecto y completo*. Editorial Posada.
- Guzmán, M., & Díaz, R. (2004). *CARACTERÍSTICAS DE LOS FERTILIZANTES PARA SU USO EN LA FERTIRRIGACIÓN* (pp. 191–202).
- Haghighi, M., & Teixeira Da Silva, J. A. (2014). The effect of N-TiO₂ on tomato, onion, and radish seed germination. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(4), 221–227.
<https://doi.org/10.1007/s12892-014-0056-7>
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, 142, 231–

255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Han, C., & Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, *15*(10), 1671–1679. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400375>
- Hao, Y., Zhang, Z.-T., Rui, Y.-K., Ren, J.-Y., Hou, T.-Q., Wu, S.-J., Rui, M.-M., Jiang, F.-P., & Liu, L.-M. (2016). *Effect of Different Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth in Rice*. 166–173. <https://doi.org/10.2991/ame-16.2016.28>
- He, H. (2020). 2—Metal oxide semiconductors and conductors. En Z. Cui & G. Korotcenkov (Eds.), *Solution Processed Metal Oxide Thin Films for Electronic Applications* (pp. 7–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814930-0.00002-5>
- Hobson, D. W., & Guy, R. C. (2024). Nanotoxicology. En P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition)* (pp. 621–625). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.01095-2>
- How Abiotic Stress Conditions Affects Plant Roots*. (2020). <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.95286>
- Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants*. (s/f). <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Iqbal, Z., Ansari, M. I., Ahmad, A., Haque, Z., & Iqbal, M. S. (2021). Impact of Nanomaterials Stress on Plants. En J. M. Al-Khayri, M. I. Ansari, & A. K. Singh (Eds.), *Nanobiotechnology: Mitigation of Abiotic Stress in Plants* (pp. 499–526). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73606-4_22
- Itrotwar, P., Kasivelu, G., Raguraman, V., Kannan, M., & Sevathapandian, S. (2020). Effects of biogenic zinc oxide nanoparticles on seed germination and seedling vigor of maize (*Zea mays*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*, 101778. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101778>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jhazab, H. M., Razzaq, A., Jilani, G., Rehman, A., Hafeez, A., & Yasmeen, F. (2015). Silver nano-particles enhance

- the growth, yield and nutrient use efficiency of wheat. *Int J Agron Agri Res*, 7(1), 15–22.
https://www.researchgate.net/profile/Farhat-Yasmeen-4/publication/282404496_Silver_nano-particles_enhance_the_growth_yield_and_nutrient_use_efficiency_of_wheat/links/560f6a4708ae48337517beea/Silver-nano-particles-enhance-the-growth-yield-and-nutrient-use-efficiency-of-wheat.pdf
- Jiang, H. S., Yin, L. Y., Ren, N. N., Zhao, S. T., Li, Z., Zhi, Y., Shao, H., Li, W., & Gontero, B. (2017). Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology*, 11(2), 157–167. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>
- Karpinska, B., Alomrani, S. O., & Foyer, C. H. (2017). Inhibitor-induced oxidation of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*: Implications for organelle to nucleus retrograde signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1730), 20160392.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0392>
- Khan, I., Awan, S. A., Rizwan, M., Hassan, Z. U., Akram, M. A., Tariq, R., Brestic, M., & Xie, W. (2022). Nanoparticle's uptake and translocation mechanisms in plants via seed priming, foliar treatment, and root exposure: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(60), 89823–89833.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-23945-2>
- Khan, M. M., Adil, S. F., & Al-Mayouf, A. (2015). Metal oxides as photocatalysts. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(5), 462–464. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2015.04.003>
- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., & Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection*, 35, 64–70.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>
- Kokina, I., Plaksenkova, I., Jermaļonoka, M., & Petrova, A. (2020). Impact of iron oxide nanoparticles on yellow medick (*Medicago falcata* L.) plants. *Journal of Plant Interactions*, 15(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1708489>
- Kushwah, K. S., & Patel, S. (2020). Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO₂ NPs) on Faba bean (*Vicia faba*

- L.) and Induced Asynaptic Mutation: A Meiotic Study. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 1107–1118. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10046-7>
- Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Trcera, N., Sorieul, S., Cécillon, L., Ouerdane, L., Legros, S., & Sarret, G. (2014). Fate of pristine TiO₂ nanoparticles and aged paint-containing TiO₂ nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.014>
- Lee, D. (2010). Nature's Palette: The Science of Plant Color. En *Nature's Palette*. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/9780226471051>
- Londoño Londoño, J. A. (2012). *Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Corporación Universitaria Lasallista. <http://repository.unilasallista.edu.co/dspace//handle/10567/133>
- Lyu, S., Wei, X., Chen, J., Wang, C., Wang, X., & Pan, D. (2017). Titanium as a Beneficial Element for Crop Production. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00597>
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment*, 408(16), 3053–3061. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969710003025>
- Mahakham, W., Sarmah, A. K., Maensiri, S., & Theerakulpisut, P. (2017). Nanoprimer technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 8263. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5>
- Martínez, E. D., Prado, A., Gonzalez, M., Anguiano, S., Tosi, L., Salazar Alarcón, L., & Pastoriza, H. (2021). Recent Advances on Nanocomposite Resists With Design Functionality for Lithographic Microfabrication. *Frontiers in Materials*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmats.2021.629792>
- Matilla, A. (2008). *Desarrollo y germinación de las semillas* (pp. 537–558).
- Mayoral, J. B., Hernández, M. V., & Silveti-Loeza, A. (2019). Análisis de la actividad antioxidante en la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) mediante las técnicas FRAP y DPPH. *RD-ICUAP*, 5(14).

- Millán-Chiu, B. E., del Pilar Rodríguez-Torres, M., & Loske, A. M. (2020). Nanotoxicology in Plants. En J. K. Patra, L. F. Fraceto, G. Das, & E. V. R. Campos (Eds.), *Green Nanoparticles: Synthesis and Biomedical Applications* (pp. 43–76). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39246-8_3
- Missaoui, T., Smiri, M., Chemingui, H., & Hafiane, A. (2021). Effect of Nanosized TiO₂ on Redox Properties in Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) during Germination. *Environmental Processes*, *8*(2), 843–867. <https://doi.org/10.1007/s40710-020-00493-w>
- Mushinskiy, A., & Aminova, E. (2019). Effect of iron, copper and molybdenum nanoparticles on morphometric parameters of *Solanum tuberosum* L. plants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *341*, 012195. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/341/1/012195>
- Nalwa, C., & Seth, M. (2021). Physiology of Seed Dormancy and Germination-A Review. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 557–562. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i58A34151>
- Nguyen, D. T. C., Le, H. T. N., Nguyen, T. T., Nguyen, T. T. T., Bach, L. G., Nguyen, T. D., & Tran, T. V. (2021). Multifunctional ZnO nanoparticles bio-fabricated from *Canna indica* L. flowers for seed germination, adsorption, and photocatalytic degradation of organic dyes. *Journal of Hazardous Materials*, *420*, 126586. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126586>
- Nwokeji, P., Enodiana, O. I., Ezenweani, R., Osasere, O.-I., Akatah, H., & Abiola. (2016). *The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites*.
- OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027 | OECD-FAO Agricultural Outlook | OECD iLibrary. (s/f). Recuperado el 31 de agosto de 2023, de https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2018-2027_agr_outlook-2018-en
- Okupnik, A., & Pflugmacher, S. (2016). Oxidative stress response of the aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata* exposed to TiO₂ nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *35*(11), 2859–2866. <https://doi.org/10.1002/etc.3469>

Oprică, L., & Bălășoiu, M. (2019). NANOPARTICLES: AN OVERVIEW ABOUT THEIR CLASIFICATIONS, SYNTHESIS, PROPERTIES, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS. *Journal of Experimental and Molecular Biology*, 20(4), Article 4.

Organic Nanomaterials: Synthesis, Characterization, and Device Applications | Wiley. (s/f). Wiley.Com.

Recuperado el 28 de agosto de 2023, de [https://www.wiley.com/en-](https://www.wiley.com/en-us/Organic+Nanomaterials%3A+Synthesis%2C+Characterization%2C+and+Device+Applications-p-9781118016015)

[us/Organic+Nanomaterials%3A+Synthesis%2C+Characterization%2C+and+Device+Applications-p-9781118016015](https://www.wiley.com/en-us/Organic+Nanomaterials%3A+Synthesis%2C+Characterization%2C+and+Device+Applications-p-9781118016015)

Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9, 293–304.

Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., & Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in Agroindustry: Applications, Toxicity, Challenges, and Trends. *Nanomaterials*, 10(9), 1654. <https://doi.org/10.3390/nano10091654>

Parola-Contreras, I., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., Reynoso-Camacho, R., Pérez-Ramírez, I. F., Ocampo-Velázquez, R. V., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F., Tovar-Pérez, E. G., Parola-Contreras, I., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., Reynoso-Camacho, R., Pérez-Ramírez, I. F., Ocampo-Velázquez, R. V., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F., & Tovar-Pérez, E. G. (2021). Phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from leaves and flowers of chilcuague (*Heliopsis longipes*, Asteraceae). *Botanical Sciences*, 99(1), 149–160. <https://doi.org/10.17129/botsoci.2671>

Parveen, A., & Rao, S. (2015). Effect of Nanosilver on Seed Germination and Seedling Growth in *Pennisetum glaucum*. *Journal of Cluster Science*, 3(26), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s10876-014-0728-y>

Pérez-de-Luque, A. (2017). Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture? *Frontiers in Environmental Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2017.00012>

Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*.

<https://hdl.handle.net/20.500.14352/50406>

Pitambar, Archana, & Shukla, Y. (2019). *Nanofertilizers: A Recent Approach in Crop Production* (pp. 25–58).

https://doi.org/10.1007/978-981-32-9374-8_2

Poddar, K., Sarkar, D., & Sarkar, A. (2020). Nanoparticles on Photosynthesis of Plants: Effects and Role. En J. K.

Patra, L. F. Fraceto, G. Das, & E. V. R. Campos (Eds.), *Green Nanoparticles: Synthesis and Biomedical*

Applications (pp. 273–287). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-](https://doi.org/10.1007/978-3-030-39246-8_13)

[39246-8_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-39246-8_13)

Price, A. H., Atherton, N. M., & Hendry, G. A. F. (1989). Plants Under Drought-Stress Generate Activated Oxygen.

Free Radical Research Communications, 8(1), 61–66. <https://doi.org/10.3109/10715768909087973>

Rafique, R., Zahra, Z., Virk, N., Shahid, M., Pinelli, E., Park, T. J., Kallerhoff, J., & Arshad, M. (2018). Dose-

dependent physiological responses of *Triticum aestivum* L. to soil applied TiO₂ nanoparticles:

Alterations in chlorophyll content, H₂O₂ production, and genotoxicity. *Agriculture, Ecosystems &*

Environment, 255, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.010>

Raj, A., & Sheeja, R. (2019). Seed priming: An approach towards agricultural sustainability. *Journal of Applied*

and Natural Science, 11, 227–234. <https://doi.org/10.31018/jans.v11i1.2010>

Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed Germination and Vigor.

Annual review of plant biology, 63, 507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>

Ranjan, A., Rajput, V. D., Minkina, T., Bauer, T., Chauhan, A., & Jindal, T. (2021). Nanoparticles induced stress

and toxicity in plants. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, 100457.

<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100457>

Rodríguez-González, V., Terashima, C., & Fujishima, A. (2019). Applications of photocatalytic titanium dioxide-

based nanomaterials in sustainable agriculture. *Journal of Photochemistry and Photobiology C:*

Photochemistry Reviews, 40, 49–67. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.06.001>

Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2021). Abiotic Stress and Reactive

- Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants*, 10(2), Article 2.
<https://doi.org/10.3390/antiox10020277>
- Sanchez, M. M. (2018). *INDUCCIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS NUTRACÉUTICO EN GERMINADOS DE FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.) Y EL EFECTO DE SU CONSUMO EN UN MODELO DE DISLIPIDEMIA*. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1176>
- Santás-Miguel, V., Arias-Estévez, M., Rodríguez-Seijo, A., & Arenas-Lago, D. (2023). Use of metal nanoparticles in agriculture. A review on the effects on plant germination. *Environmental Pollution*, 334, 122222.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122222>
- Sanzari, I., Leone, A., & Ambrosone, A. (2019). Nanotechnology in plant science: To make a long story short. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 120.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00120/full>
- School of Studies in Botany, Jiwaji University, Gwalior-474011, Madhya Pradesh, India, Verma, D. K., Patel, S., School of Studies in Botany, Jiwaji University, Gwalior-474011, Madhya Pradesh, India, Kushwah, K. S., & School of Studies in Botany, Jiwaji University, Gwalior-474011, Madhya Pradesh, India. (2020). Synthesis of Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles and impact on morphological changes, seeds yield and phytotoxicity of *Phaseolus vulgaris* L. *Tropical Plant Research*, 7(1), 158–170.
<https://doi.org/10.22271/tpr.2020.v7.i1.021>
- Secondary Plant Metabolites: Mechanisms and Roles in Insect Pest Management. (2016). En *Plant Secondary Metabolites, Volume Three*. Apple Academic Press.
- Shaban, M. (2013). Effect of Water and Temperature on Seed Germination and Emergence as a Seed Hydrothermal Time Model. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(12), 1686–1691.
- Shah, T., Latif, S., Saeed, F., Ali, I., Ullah, S., Abdullah Alsahli, A., Jan, S., & Ahmad, P. (2021). Seed priming with titanium dioxide nanoparticles enhances seed vigor, leaf water status, and antioxidant enzyme activities

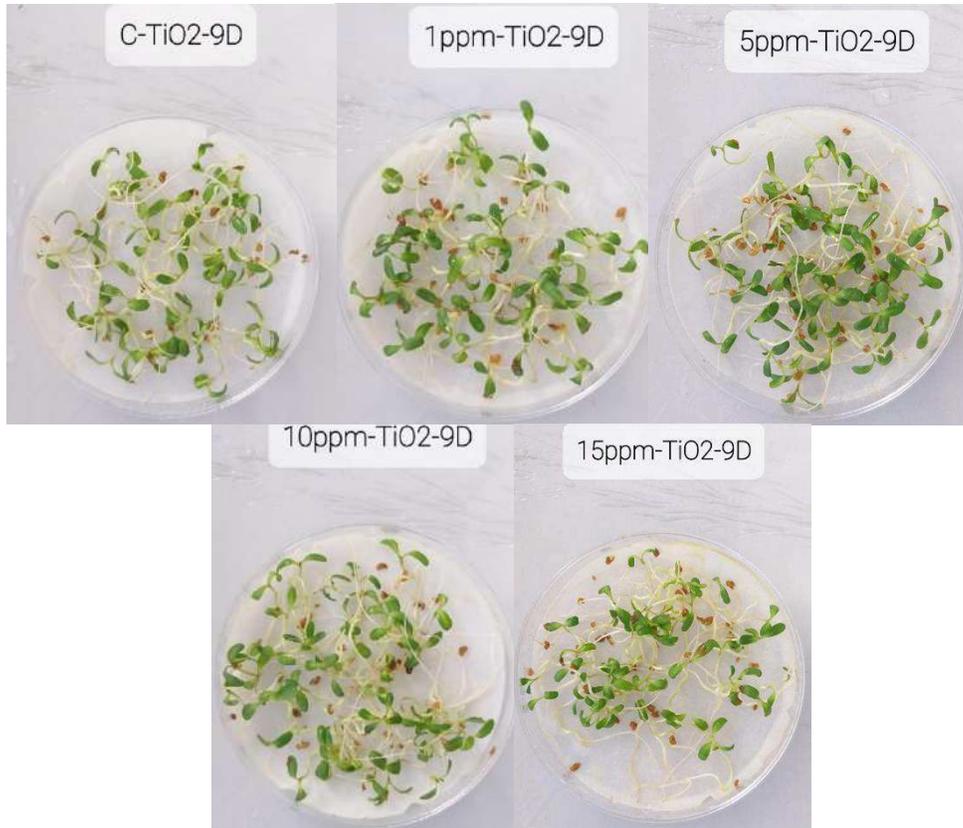
- in maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Journal of King Saud University - Science*, 33(1), 101207.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.10.004>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sharifi-Rad, J., Sharifi-Rad, M., & Silva, J. (2016). Morphological, Physiological and Biochemical Responses of Crops (*Zea mays* L., *Phaseolus vulgaris* L.), Medicinal Plants (*Hyssopus officinalis* L., *Nigella sativa* L.), and Weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Taraxacum officinale* F. H. Wigg) Exposed to SiO₂ Nanoparticles. *Journal of Agricultural Science and Technology*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Morphological%2C-Physiological-and-Biochemical-of-L.%2C-Sharifi%E2%80%90Rad-Sharifi-Rad/d26d93200427baf0973bd5091bdf1fe4126f95cb>
- Shitan, N. (2016). Secondary metabolites in plants: Transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(7), 1283–1293. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1151344>
- Silva, S., Arrieta-Cortes, R., Fernández-Luqueño, F., & López-Valdez, F. (2018). *Design and Production of Nanofertilizers: Modern Agriculture for a Sustainable Future* (pp. 17–31). https://doi.org/10.1007/978-3-319-96719-6_2
- Simonin, M., Martins, J. M. F., Le Roux, X., Uzu, G., Calas, A., & Richaume, A. (2017). Toxicity of TiO₂ nanoparticles on soil nitrification at environmentally relevant concentrations: Lack of classical dose-response relationships. *Nanotoxicology*, 11(2), 247–255.
<https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1290845>
- Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., Subramaniam, S., Golovko, V., Anderson, D., Sokolik, A., Colbeck, I., & Demidchik, V. (2016). Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 85(2), 245–257. <https://doi.org/10.1111/tpj.13105>
- Sun, Y., Yang, C., & Tsao, R. (2018). Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity

- assays. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*, 1–19.
- Sundaram Sanjay, S., & Shukla, A. K. (2021). Mechanism of Antioxidant Activity. En S. Sundaram Sanjay & A. K. Shukla, *Potential Therapeutic Applications of Nano-antioxidants* (pp. 83–99). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-1143-8_4
- Szóllósi, R., Molnár, Á., Kondak, S., & Kolbert, Z. (2020). Dual Effect of Nanomaterials on Germination and Seedling Growth: Stimulation vs. Phytotoxicity. *Plants*, 9(12), Article 12.
<https://doi.org/10.3390/plants9121745>
- Teoh, E. S. (2015). Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia*, 59–73.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5
- Tighe-Neira, R., Reyes-Díaz, M., Nunes-Nesi, A., Recio, G., Carmona, E., Corgne, A., Rengel, Z., & Inostroza-Blancheteau, C. (2020). Titanium dioxide nanoparticles provoke transient increase in photosynthetic performance and differential response in antioxidant system in *Raphanus sativus* L. *Scientia Horticulturae*, 269, 109418. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109418>
- Tiku, A. R. (2018). Antimicrobial Compounds and Their Role in Plant Defense. En A. Singh & I. K. Singh (Eds.), *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 283–307). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_13
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P. K., Singh, V. P., Singh, S., Prasad, S. M., Singh, P. K., Dubey, N. K., & Pandey, A. C. (2017). Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 167–177.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942816302364>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., & Bracale, M. (2013). Morphological and

- Proteomic Responses of *Eruca sativa* Exposed to Silver Nanoparticles or Silver Nitrate. *PLOS ONE*, 8(7), e68752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068752>
- Varma, S., & Jangra, M. (2021). *Heavy metals stress and defense strategies in plants: An overview*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Heavy-metals-stress-and-defense-strategies-in-An-Varma-Jangra/6f55f4e309ed1ab0a8240589e45648f0910e7eb3>
- Vázquez-Ramos, J., & Sanchez, M. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*, 13, 113–130. <https://doi.org/10.1079/SSR2003130>
- Vydiam, K., & Mukherjee, S. (2023). Chapter 22—3D and 4D nanocomposites. En A. Husen & K. S. Siddiqi (Eds.), *Advances in Smart Nanomaterials and their Applications* (pp. 505–522). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99546-7.00014-8>
- Wang, J., & Fan, Y. (2014). Lung injury induced by TiO₂ nanoparticles depends on their structural features: Size, shape, crystal phases, and surface coating. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22258–22278. <https://doi.org/10.3390/ijms151222258>
- Weitbrecht, K., Mueller, K., & Leubner, G. (2011). First off the mark: Early seed germination. *Journal of experimental botany*, 62, 3289–3309. <https://doi.org/10.1093/jxb/err030>
- Zhang, Y., Xu, J., Li, R., Ge, Y., Li, Y., & Li, R. (2023). Plants' Response to Abiotic Stress: Mechanisms and Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms241310915>

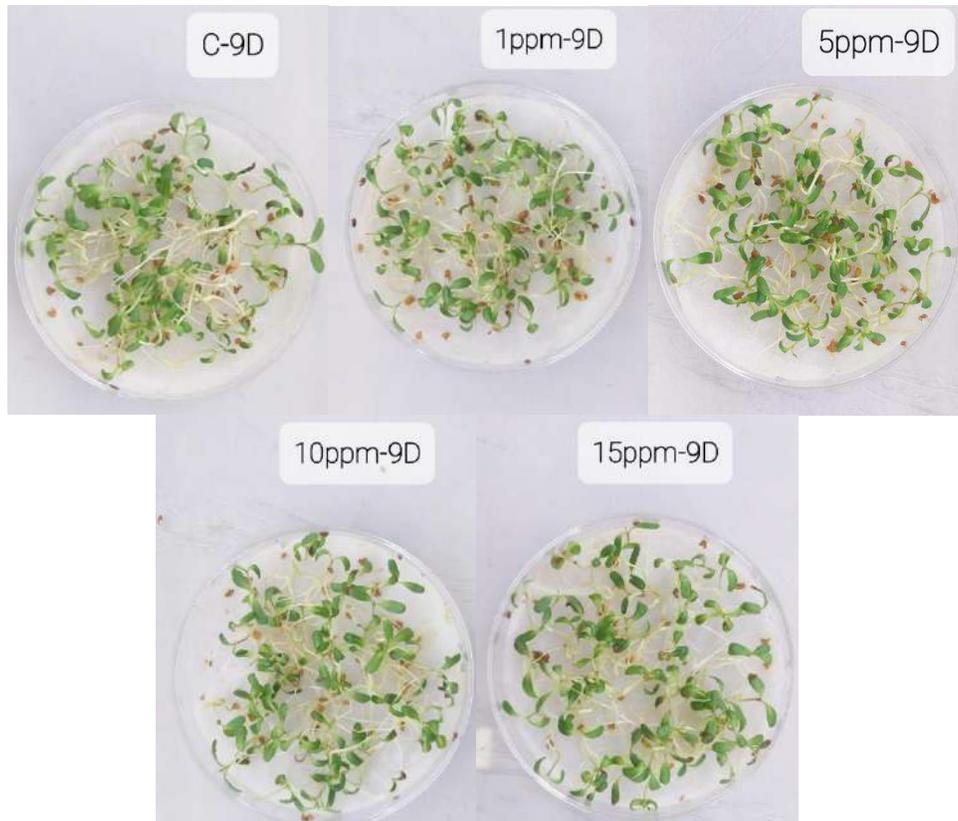
12. ANEXOS

Fotografías de crecimiento TiO_2



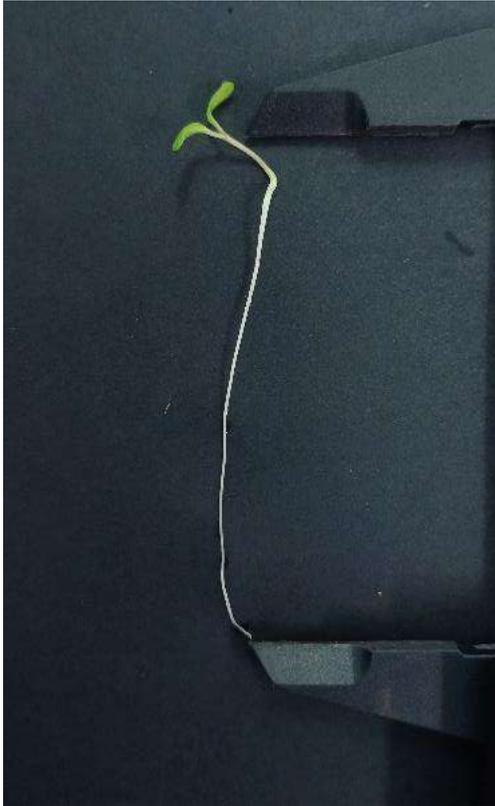
Germinados de Alfalfa con 9 días de crecimiento tratados con TiO_2 .

Fotografías de crecimiento Ag-TiO₂.



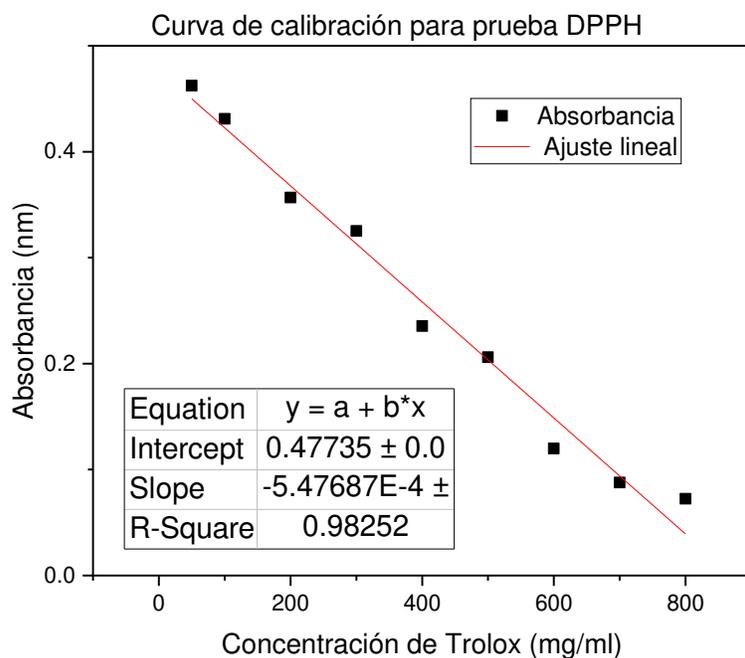
Germinados de Alfalfa con 9 días de crecimiento tratados con Ag-TiO₂.

Medición de Radícula y hojas.



Metodología para medir parámetros de longitud radicular y de hoja en germinados de alfalfa de 9 días de crecimiento.

Tratamientos de TiO₂ y Ag-TiO₂
Curva de calibración para análisis DPPH



ABTS
Curva de calibración para análisis DPPH

