

EFECTO DEL SUMINISTRO DE UNA SUSPENSIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO IMPURIFICADO CON PLATA SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA RAZÓN DE EVOLUCIÓN DE OXÍGENO DE PLANTAS DE ESPINACA (*Spinacia oleracea L*), EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE PLATA ADICIONADA

EFECTO DEL SUMINISTRO DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO INCORPORADAS CON PLATA EN CULTIVO DE ESPINACA

Fernando Gordillo-Delgado^{1,2}, Daniel Felipe Casas-Castañeda¹, Jhon Didier García-Aguilar^{1¶}.

¹ Applied Science Research Group for the Development of the Ecoregion (GICADE) assigned to Interdisciplinary Institute of Sciences, University of Quindío, Armenia – Quindío, Colombia.

² Electronic Instrumentation Technology Program, University of Quindío. Armenia, Colombia.

RESUMEN: Entre los productos alimenticios, la espinaca ocupa un lugar sobresaliente por ser una hortaliza con valiosos aportes nutricionales de vitamina A, B1 y C. En Colombia, la producción de esta verdura es reducida y se tiene poca información técnica del manejo local de enfermedades y plagas que afectan este cultivo, así como de la forma óptima de fertilización. En este trabajo se analizó el efecto de la inoculación en semillas de espinaca de nanopartículas (NPs) de dióxido de titanio con plata incorporada (TiO₂-Ag), de tamaño de partícula alrededor de 10 nm, obtenidas por el método Sol-Gel; la Ag se incorporó durante la síntesis y se varió la proporción de nitrato de plata adicionada. La caracterización de estas NPs en polvo se hizo utilizando espectroscopia, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz. Las NPs suspendidas en agua destilada se inocularon en las semillas y las plántulas que brotaron se sembraron en un medio hidropónico, se registraron algunos datos relacionados con el crecimiento y se monitoreó su actividad fotosintética mediante la técnica fotoacústica. El comportamiento de los cambios morfológicos y de la razón de evolución de oxígeno (REO) se compararon con los de plantas de un grupo control y se evaluaron las diferencias de los efectos de cada tratamiento. Los resultados permiten afirmar que el suministro de NPs de TiO₂-Ag afectó el comportamiento de la altura de las plantas de espinaca y los valores de la REO en relación con el contenido de Ag adicionado.

Palabras claves: espinaca, fotoacústica, fotosíntesis, nanopartículas de TiO₂, razón de evolución de oxígeno.

ABSTRACT: Among the food products, spinach occupies an outstanding place for being a vegetable with valuable nutritional contributions of vitamin A, B1 and C. In Colombia, the production of this vegetable is reduced and there is little technical information about the local management of diseases and pests that affect this crop, as well as the optimal form of fertilization. In this work, it was analyzed the effect of the inoculation of nanoparticles (NPs) of titanium dioxide with incorporated silver (TiO₂-Ag), of particle size around 10 nm, obtained by Sol-Gel method, on spinach seeds; Ag was incorporated during the synthesis and the proportion of added silver nitrate was varied. The characterization of these powdered NPs was done using spectroscopy, X-ray diffraction, scanning electron microscopy and dynamic light scattering. The NPs suspended in distilled water were inoculated in the seeds and the seedlings that sprouted were sowed in a hydroponic medium, some data related to growth were recorded and their photosynthetic activity was monitored by photoacoustic technique. The behavior of morphological changes and the ratio of oxygen evolution (ROE) were compared with those of plants from a control group and the differences in the effects of each treatment were evaluated. The results allow affirming that the supply of TiO₂-Ag NPs affected the height behavior of spinach plants and the ROE values in relation to the added Ag content.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

Key words: spinach, photoacoustic, photosynthesis, TiO₂ nanoparticles, ratio of oxygen evolution.

INTRODUCCIÓN

Las hortalizas son plantas herbáceas, utilizadas en su mayoría como alimento. Su consumo es necesario en la dieta del ser humano, ya que aporta vitaminas, minerales, carbohidratos y fibra (Saavedra Del Real, 2013). En particular, la espinaca (*Spinacia oleracea L.*) es una hortaliza con bajo contenido de calorías, grasa y proteína, que suministra fibra y nutrientes como la vitamina A, B1, C y K; de igual manera, contiene ácido fólico que cumple un rol importante en el desarrollo del material genético, desarrollo del tubo neural en las primeras semanas de gestación y participa en la producción de células sanguíneas y reparación de músculos (Favell, 1998). Se estima que en Colombia hay alrededor de 12850 hectáreas sembradas con este cultivo, en su mayoría en la región central del país; Cundinamarca es el mayor productor. Desafortunadamente este cultivo no tiene un impacto local a gran escala, lo que ha ocasionado la insuficiencia de manuales y alternativas para tratar problemas de producción, en gran parte relacionados con el control de enfermedades y plagas (Srilatha, 2011).

La agricultura se ha transformado para cumplir las exigencias del mercado, pero una parte cada vez más grande de la población demanda alimentos sanos, frescos, terapéuticos y de calidad nutricional, que contengan proteínas, vitaminas, fibra y minerales y que no presenten trazas de sustancias tóxicas (Saavedra Del Real, 2013). El uso de pesticidas es la estrategia más usada para prevenir y combatir los problemas de producción y enfermedades. Sin embargo, esta solución no es adecuada en términos medioambientales y de sostenibilidad. En las últimas décadas, se han implementado alternativas para minimizar el uso de este tipo de productos; una de éstas relacionada con el empleo de la nanotecnología. Esta disciplina se enfoca en el control y manipulación de materia a escala atómica, lo que lleva a obtener materiales con nuevas características (Jampílek & Král'ová, 2015; Mesci-Haftaci et al., 2014).

La fitonanotecnología se enfoca en solucionar fallas en los sistemas de cultivo, que se presentan debido a la resistencia de las plagas y enfermedades a los pesticidas comunes, a la ineficiencia en la absorción de fertilizantes de origen sintético y al bajo rendimiento en la producción de alimentos (Nuruzzaman et al., 2016). Las nanopartículas (NPs) de tamaños entre 0.1 y 100 nm son capaces de interactuar o traspasar las membranas plasmáticas de las células e integrarse con otros materiales (Alejandro & Rubiales, 2009). Es por esta razón, que se involucra la inoculación de NPs a base de carbón o metales a escala nanométrica en las plantas (Khodakovskaya et al., 2009).

El dióxido de titanio (TiO₂) es uno de los materiales con mayor potencial para este tipo de aplicaciones. Este compuesto se caracteriza por ser un semiconductor sensible a la luz, que absorbe radiación electromagnética en la región del UV. Por otro lado, las NPs de plata tienen alta conductividad, estabilidad química y actividad catalítica y antimicrobiana. En las industrias médicas, de alimentos y en la agricultura, las NPs metálicas tienen efectos contra patógenos, insectos y plagas que afectan a las plantas (Rai & Ingle, 2012).

En este trabajo se evaluó la inoculación de NPs de TiO₂-Ag con diferente contenido de Ag en semillas de espinaca (*Spinacia oleracea L.*), por medio del análisis de los efectos en el desarrollo vegetal y en la Razón de Evolución de Oxígeno (REO) de las plantas, mediante el empleo de la técnica fotoacústica. Los datos obtenidos durante el monitoreo de estos parámetros morfoanatómicos y fotosintéticos fueron sometidos a un análisis estadístico con el fin de observar diferencias entre los tratamientos, con referencia a un grupo de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis y caracterización de TiO₂-Ag

Las NPs de TiO₂ fueron sintetizadas con la técnica de sol-gel, utilizando como precursor un alcóxido de titanio, se adicionaron 6.2 mL de titanio (IV)-bis(acetilacetato) diisopropóxido (solución al 75 % en 2- propanol) en 25 mL de 2- propanol; esta mezcla se agitó durante 5 min y posteriormente se llevó a cabo una hidrólisis adicionando gota a gota una solución de 0.45 mL de agua destilada en 25 mL de 2- propanol, lo que ayuda a la formación de Ti(OH)₄. En 0.45 mL de agua destilada se disolvieron por separado 0.00531 g, 0.01063 g y 0.015 g de nitrato de plata (AgNO₃) para obtener las proporciones de 0.25, 0.50 y 0.75 %, que fueron mezcladas con el Ti(OH)₄. Después se calentó la solución en una mufla a 100 °C hasta disminuir el volumen a la mitad; la solución restante se secó a temperatura ambiente. Luego, en un crisol se trituro el sólido obtenido y se llevó a la mufla a una temperatura de 400 °C por 1 hora y 30 minutos, hasta obtener un sólido de color blanco (Cargnello et al., 2014). Las muestras obtenidas se caracterizaron estructuralmente con difracción de rayos X (DRX), mientras que la morfología y composición se analizaron usando dispersión dinámica de luz y un equipo de microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés de Scanning Electron Microscopy) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS por sus siglas en inglés de Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy).

Análisis del crecimiento de plantas de espinaca

Se utilizaron semillas de espinaca certificadas por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). Estas se mantuvieron remojadas en las suspensiones de las NPs de TiO₂-Ag (0.25 %, 0.50 % y 0.75 %), en concentración de 0.25 %, durante 3 días a temperatura promedio de 17 °C, con períodos alternos de dos horas de exposición lumínica solar y después de este proceso de inoculación fueron regadas diariamente hasta su germinación. La siembra se hizo en un sustrato hidropónico estéril y posteriormente fueron trasplantadas a una mezcla de arena cuarcítica y materia orgánica. Estas se mantuvieron en condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 20 °C y humedad relativa del 60 %. Así mismo, se tomaron medidas morfológicas de altura, número de hojas emitidas, largo y ancho de las hojas, cada semana durante 5 semanas. Cada tratamiento se hizo sobre veinte plantas, mismo número correspondiente a los dos grupos de control a los que se les aplicó agua destilada y TiO₂. Las plántulas fueron regadas semanalmente mediante microaspersión con las NPs de TiO₂-Ag, suspendidas en agua a una concentración de 0.25 %, garantizando el microriego en igual proporción a cada planta. La fertirrigación se hizo semanalmente con fertilizantes foliares comerciales (Todo en uno: nitrógeno total (n) 42,5%; nitrógeno amoniacal 1.2%; nitrógeno ureico 41,3%; calcio (Ca) 0.056%; magnesio (Mg) 0.315%; azufre total (s) 0.450%; boro (b) 0.034%; cobre (cu) 0.036%; hierro (fe) 0.047%; manganeso (mn) 0.100%; molibdeno (mo) 0.05%; zinc (zn) 0.100%) y edáficos (Triple 15: nitrógeno total 14.6%; fósforo (P₂O₅) 14.7%; potasio (K₂O) 14.6%; azufre total (S) 10.5%). Los resultados obtenidos se sometieron a un ANOVA para identificar posibles diferencias significativas entre el control y las plantas tratadas con las NPs de TiO₂-Ag. De esta forma, se evaluó la altura, el número de hojas emitidas y el largo y ancho de la hoja.

Actividad fotosintética

La razón de evolución de oxígeno (REO), relacionada con la actividad fotosintética, se estimó mediante la técnica fotoacústica (FA). Ésta hace parte de un conjunto de métodos fototérmicos en los que se hace incidir un haz de luz, modulado periódicamente, sobre el material de estudio; la radiación absorbida genera parcialmente calor; de tal forma que la temperatura y por tanto la presión de una capa de aire adyacente a la muestra cambian con la misma frecuencia de la modulación de la luz incidente. El sonido que se produce de esta forma es traducido en voltaje por un micrófono y se conoce como señal FA. Teniendo en cuenta que durante este proceso pueden suceder fenómenos fotoquímicos como el de la fotosíntesis, cuando se radia la hoja de una planta con luz visible, la contribución por liberación periódica de oxígeno se suma a la señal FA. El descuento de esta

contribución a partir de la saturación de la actividad fotosintética por iluminación con un haz de luz continuo e intenso, permite la determinación de la REO.

Es decir, de las curvas de amplitud de la señal FA en función del tiempo, que se obtienen saturando el proceso de fotosíntesis, se determina el porcentaje de reducción de la señal al descontar la componente “fotobárica” o REO. Con esta técnica se puede evaluar la influencia que tiene un tratamiento determinado, a través del monitoreo de la actividad fotosintética, ya que la fisiología de las plantas es afectada por las condiciones de cultivo (Elahi et al., 2021). De esta forma, en este trabajo se estimó la REO durante 50 días de 3 plantas escogidas al azar por cada tratamiento (TiO₂-Ag (0.25 %, 0.50 % y 0.75 %)) y por cada grupo de control (TiO₂ y agua -destilada); las medidas se hicieron entre las 14:00 y las 16:00 horas.

Al igual que para los parámetros morfoanatómicos, los datos de REO fueron sometidos a un ANOVA con el fin de determinar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los diferentes grupos estudiados. Finalmente, se aplicó un Análisis de Componentes Principales para representar el conjunto de datos que se obtiene al unir los valores de los parámetros morfoanatómicos y los de la REO en un conjunto de máximo dos dimensiones.

Como se mencionó anteriormente, el análisis estadístico de los datos consistió básicamente en la implementación de un Análisis de Varianza ANOVA tanto para las variables morfoanatómicas como para la REO y un Análisis de Componentes Principales ACP considerando ambos grupos de variables. Este análisis estadístico se llevó a cabo en una plataforma software basada en el lenguaje de programación Python, ya que es una plataforma orientada a este tipo de análisis por lo que ofrece una gran variedad de herramientas útiles y cierta facilidad en su uso. Para ambas pruebas estadísticas, los datos previamente fueron sometidos a un preprocesamiento el cual consistió en la normalización de estos. Con la normalización se busca que los datos presenten una distribución normal, esto se logra haciendo que su media sea igual a cero y su varianza sea de 1. En términos del ANOVA, para aquellas variables en las que se presentó diferencias estadísticas significativas, fueron sometidas posteriormente a una prueba de comparación múltiple denominada prueba de Tukey para determinar entre que grupos se presentaron dichas diferencias. Respecto al ACP, a partir de los valores y vectores propios de la matriz de covarianza se estimaron las componentes principales. Con base en la varianza acumulada por cada componente, se determinaron las dos componentes que contienen la mayor cantidad de información del conjunto de datos original y en términos de estas se proyectaron las observaciones para cada una de las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y caracterización de TiO₂-Ag

Se hizo un análisis de la composición elemental de las muestras de TiO₂-Ag, a través de SEM-EDS. El incremento del contenido de Ag fue evidenciado de acuerdo con los datos en la tabla 1 y se identificó el porcentaje de masa de los elementos presentes.

Tabla 1. Composición elemental obtenida por EDX de las muestras de TiO₂-Ag.

Muestra	TiO ₂ -Ag 0.25%		TiO ₂ -Ag 0.50%		TiO ₂ -Ag 0.75%	
	Masa (%)	Átomo (%)	Masa (%)	Átomo (%)	Masa (%)	Átomo (%)
Oxígeno	35.79	52.28	37.11	52.54	34.09	46.15
Titanio	16.65	13.54	17.40	17.01	15.48	9.95
Plata	4.04	1.81	4.87	2.69	5.19	2.9

Para conocer el tamaño y la morfología de las partículas presentes en las muestras se utilizó un microscopio electrónico de barrido. En la figura 1 se observan las micrografías que muestran los tamaños promedio de las NPs finas de forma esférica con un diámetro aproximado de 9.0 ± 0.5 nm y partículas aglomeradas en una estructura porosa. Esto se obtuvo a partir del tratamiento térmico posterior a la síntesis hecha a 400 °C durante 1.5 horas. Observaciones reportadas por Andrea et al., (Andrea et al., 2011) muestran que a medida que aumenta la temperatura del tratamiento térmico, las NPs presentan mayor tamaño, lo que tiene un efecto significativo sobre la microestructura del sólido. En este caso fue difícil distinguir entre NPs de Ag y de TiO_2 , debido a que están dispersas a muy baja concentración por toda la superficie de la muestra, de manera uniforme (Kaiba et al., 2020; Liu et al., 2019; Surya et al., 2019).

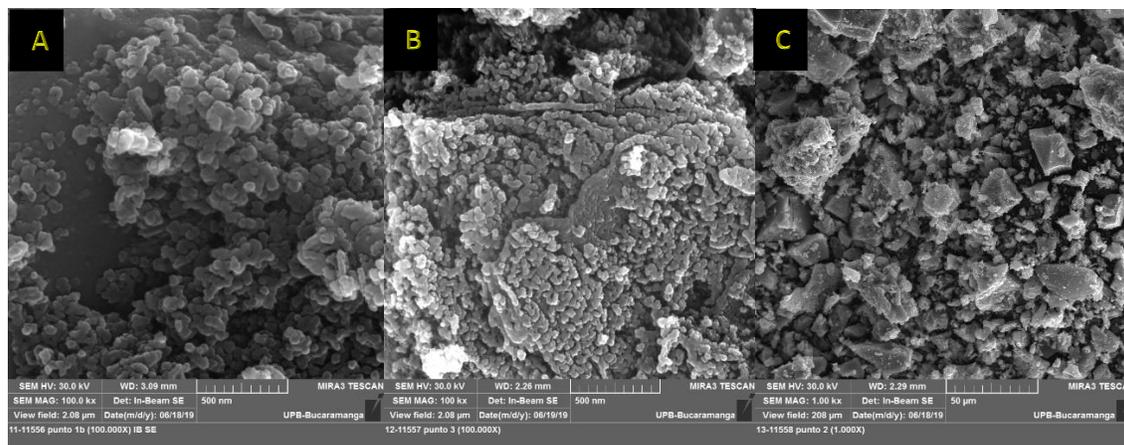


Fig. 1. Micrografías tomadas con SEM, de NPs de A) TiO_2 -Ag 0.25%. B). TiO_2 -Ag 0.50%. C) TiO_2 -Ag 0.75%.

En los difractogramas de rayos X de las muestras en polvo de TiO_2 -Ag y TiO_2 , que se muestran en la figura 2, se observan los picos característicos de la fase cristalina anatasa del TiO_2 (Andrea et al., 2011). El porcentaje de concentración de Ag adicionada al TiO_2 no influyó en la definición de la fase cristalina, que podría haber cambiado a Rutilo o Brookita.

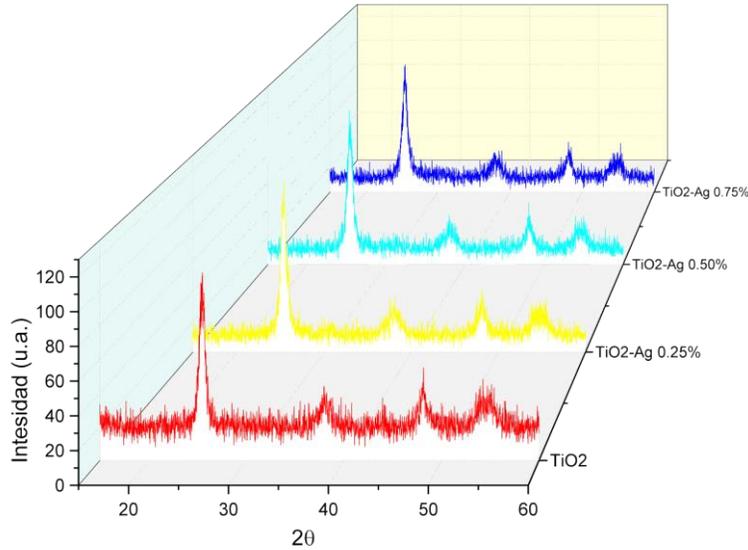
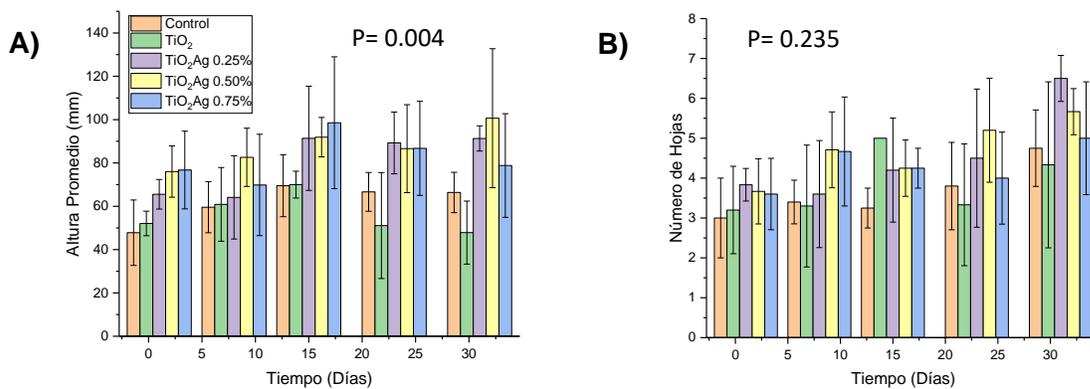


Fig. 2. Difractogramas de rayos X de las muestras de NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ en polvo, que corresponden a la fase Anatasa del TiO_2 .

Análisis de variables morfoanatómicas

Con la información correspondiente al monitoreo de las plántulas de espinaca sometidas al tratamiento con las NPs durante 5 semanas se compararon las variables morfoanatómicas, de acuerdo con las características de las NPs inoculadas. En la figura 3 se muestran los resultados del ANOVA del número de hojas emitidas (figura 3B), largo (figura 3C) y ancho promedio de las hojas (figura 3D). Aunque para estos parámetros no se presentaron diferencias significativas, para la altura promedio (figura 3A) se obtuvo un valor $P=0.004$ que indica que es significativamente diferente en función de los tratamientos con las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$.

El crecimiento y por lo tanto el largo y ancho de la hoja se estabilizaron a partir del día 15. Este comportamiento es propio del modelo biológico utilizado, ya que después de que la planta alcanza esta edad disminuye el gasto energético para producir área foliar y ganar altura mientras que se fortalecen las estructuras reproductivas (Menéndez, 2012).



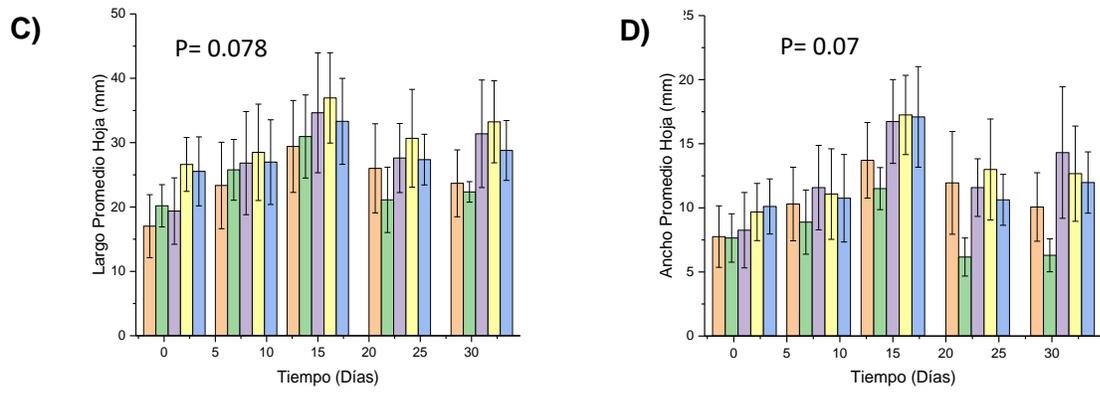


Fig. 3. Representación gráfica de parámetros morfológicos en función del tiempo: A) altura total, B) número de hojas emitidas, C) largo de la hoja y D) ancho de la hoja. En cada cuadro aparece el respectivo valor de significancia.

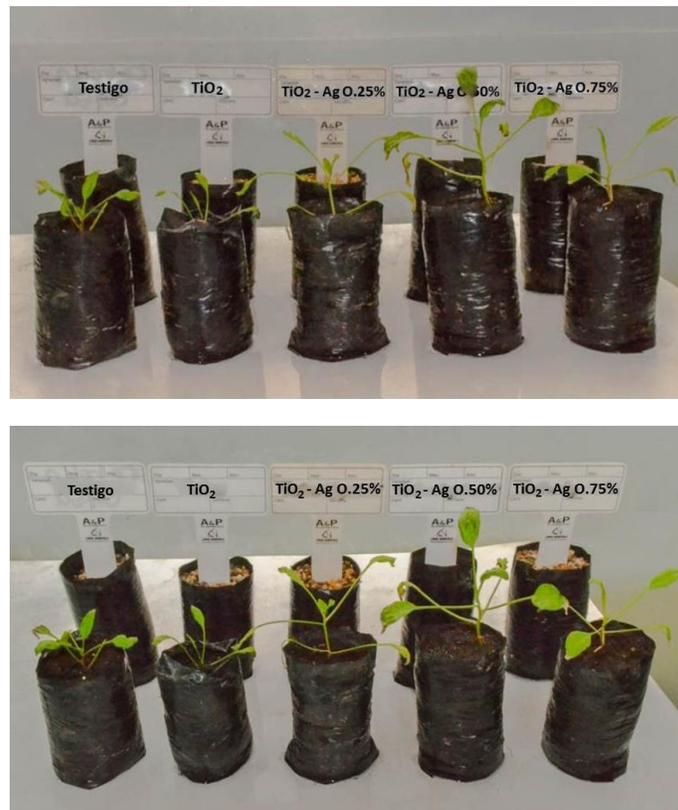




Fig 4. Plántulas de espinaca con 7 semanas de sembradas bajo el efecto del tratamiento con las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y el grupo control. Se observan las hojas verdaderas, fotosintéticamente activas. El sustrato utilizado es una mezcla de arena cuarcítica y materia orgánica.

En la figura 4 se muestra una fotografía de las plantas de espinaca; se puede notar que las tratadas con NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ presentaron mayor altura. El tratamiento con $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 0.50 % dio lugar a la mayor elevación con un aumento del 53 % con respecto al grupo control. Estas NPs que fueron proporcionadas a las plantas por microriego y aplicación al área foliar, pueden haber promovido la absorción de nitratos, que posteriormente transforman el nitrógeno inorgánico a orgánico, de tal forma que es absorbible por medio de los estomas o por las micorrizas en las raíces de las plantas. Esto hace que el nitrógeno sea más asimilable, lo que pudo llevar al aumento en el crecimiento vegetativo (Capaldi Arruda et al., 2015).

Efectos relacionados con la aplicación de TiO_2 , Ag y ZnO de tamaño nanométrico, debidos al incremento en la producción de ácido indolacético (AIA), responsable de la generación de brotes tanto en raíces como en tallos, han sido reportados en plantas de cacahuete (*Arachis hypogaea*) (Shyla, K. Natarajan, 2014). Otros autores han encontrado que estas mismas NPs generan aumento de auxinas que estimulan la división celular y posteriormente la elongación de tejidos en plantas de maní (*Arachis hypogaea*) (Rehman et al., 2012). De igual manera, Gordillo et al., 2019 (Gordillo Delgado et al., 2019), reportaron que la inoculación de NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ de tamaños de 7 y 8 nm y de concentraciones de 0.25 % y 2 % en semillas de espinaca tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, 89 % más de altura al comparar con el grupo control.

De acuerdo con estudios publicados por Prasad et al. (Prasad et al., 2012) con NPs de ZnO de tamaño de 10 ± 1 nm, disueltas en agua y aplicadas mediante microaspersión a plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) se presentó un aumento en su peso seco final del 63 % con respecto al control. Semillas de cacahuete (*Arachis hypogaea*) y plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) sometidas al mismo material nanoestructurado (MNs), con aplicaciones al follaje y al sustrato, respectivamente, a una concentración de 1000 mg L^{-1} promovió un aumento del 5 % en la germinación, del 16% en la elongación de la raíz y del 10% en la elongación del tallo, comparado con el control (Prasad et al., 2012; Zhao et al., 2013).

Actividad fotosintética

Mediante la técnica FA se estimó la REO de las plantas de espinaca bajo el efecto de la inoculación de las semillas y del suministro de las NPs. En la figura 5 A) se muestra una curva típica para la estimación de este parámetro fotosintético por este método; los puntos corresponden al promedio de los datos obtenidos en el día 49 de monitoreo. En la figura 5 B) se observa el comportamiento de la REO de los grupos de plantas durante los días en los que fueron hechas las mediciones; el p valor obtenido del ANOVA con estos datos, permite afirmar la existencia de diferencias significativas de acuerdo con el tratamiento aplicado. Durante los primeros 30 días se observó una diferencia en los valores de la REO de las plantas tratadas, comparados con los del grupo

control, pero después del día 30 de seguimiento, tanto la REO de las plantas tratadas como del grupo control presentaron una tendencia al aumento, con excepción de las correspondientes a los tratamientos con TiO_2 , TiO_2 -Ag 0.50% y TiO_2 -Ag 0.75%, para las que se observó una disminución en estos valores. Esto podría estar relacionado con un proceso de estrés causado por estos contenidos de Ag en las NPs inoculadas.

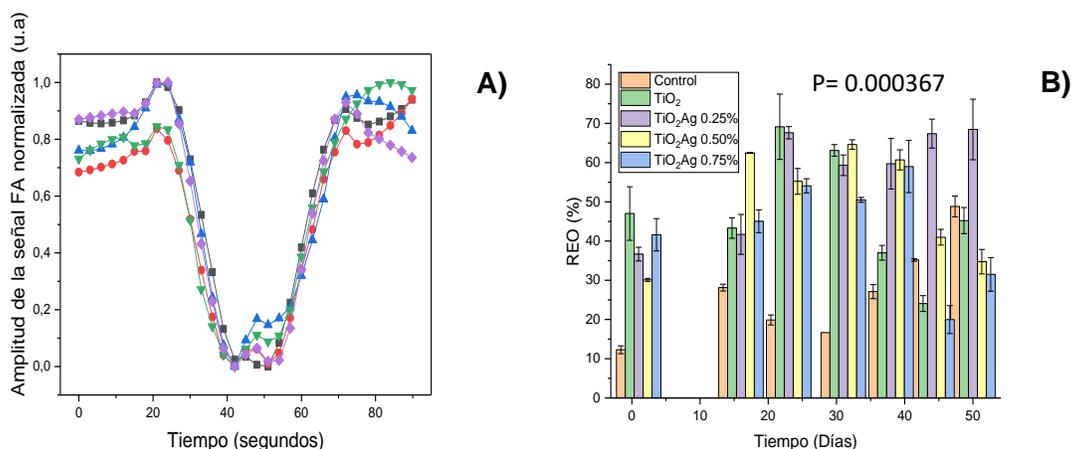


Fig 5. A) Razón de evolución de oxígeno (REO) de plantas del grupo control y de las tratadas con NPs de TiO_2 , TiO_2 -Ag 0.25%, TiO_2 -Ag 0.50% y TiO_2 -Ag 0.75%, medida el día 49 de monitoreo y B) REO promedio en función del tiempo de tratamiento.

Para determinar entre que tratamientos existe diferencia estadística significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple denominada prueba de Tukey; en la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2. Resultados de prueba de Tukey para comparación múltiple entre tratamientos a partir de los valores de la REO.

Grupo 1	Grupo 2	Dif. media	p_valor	Condición de H_0
Control	TiO_2	18,24	0,001	*
Control	$TiO_2 - Ag0.25\%$	31,52	0,001	*
Control	$TiO_2 - Ag0.50\%$	22,27	0,001	*
Control	$TiO_2 - Ag0.75\%$	16,83	0,001	*
TiO_2	$TiO_2 - Ag0.25\%$	13,28	0,0081	*
TiO_2	$TiO_2 - Ag0.50\%$	4,03	0,8193	**
TiO_2	$TiO_2 - Ag0.75\%$	-1,41	0,9	**
$TiO_2 - Ag0.25\%$	$TiO_2 - Ag0.50\%$	-9,75	0,1321	**
$TiO_2 - Ag0.25\%$	$TiO_2 - Ag0.75\%$	-14,69	0,0024	*
$TiO_2 - Ag0.50\%$	$TiO_2 - Ag0.75\%$	-5,44	0,6168	**

Se puede observar en la tabla 2 que la comparación de los datos correspondientes a los tratamientos con TiO_2 -Ag con los del grupo control presenta en todos los casos un p_valor inferior al 0,005, lo que permite descartar la hipótesis nula H_0 (*) y afirmar que existen diferencias significativas entre estos. Lo mismo ocurre entre los datos de los grupos TiO_2 y TiO_2 -Ag 0.25% y TiO_2 -Ag 0.50% y TiO_2 -Ag 0.75%. Para las demás comparaciones, no es posible descartar la hipótesis nula H_0 (**), por lo que se puede afirmar que entre estos no existen

diferencias significativas. En resumen, la inoculación de las NPs $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ afecta el proceso fotosintético; sin embargo, el porcentaje de adición de Ag que marca diferencia es el más bajo de los usados en este trabajo, 0.25 %.

La inoculación de NPs de metales en semillas o plantas por medio de microaspersión foliar o por absorción a través de las raíces, puede influir de manera negativa o positiva sobre el metabolismo de la planta, acelerando o disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno. Esto a su vez afecta directamente el intercambio gaseoso, influenciado por la forma en la que se transporta el agua; lo que induce efectos obligados en el tejido foliar (Asli & Neumann, 2009). Reportes presentados por otros autores, relacionados con plantas de maíz (*Zea mays*) tratadas con NPs de TiO_2 , muestran una tendencia al cierre de estomas y por lo tanto una disminución significativa del proceso de fotosíntesis, del intercambio gaseoso y de la transpiración, debido posiblemente a una reducción en la conductancia estomática de menos de $1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Schwabe et al., 2013; Zhang et al., 2012). Varios estudios han demostrado que NPs de Cu, Ni, Zn, y TiO_2 pueden alterar desde carbohidratos y lípidos hasta proteínas y estructuras básicas como el ADN, produciendo especies reactivas de oxígeno (ERO) por el estrés causado en las plantas. En el mismo sentido, las NPs podrían alterar desde la eficiencia fotosintética hasta procesos metabólicos fundamentales para la arquitectura de la planta (Boghossian et al., 2013; Olejnik et al., 2013; Siddiqui et al., 2015).

En una anterior publicación (Gordillo et al., 2019) se reportaron resultados sobre el efecto que tienen las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ con tamaños entre 7 y 8 nm y suministradas en concentraciones inferiores al 4% sobre la eficiencia fotosintética en plántulas de espinaca, y se encontraron por medio de la técnica de fotoacústica valores de REO de cada uno de los tratamientos cercanos al control. Sin embargo, con tamaños y concentraciones más altas de NPs, la REO se alejó de la correspondiente al control, lo que se posiblemente se traduce en aceleración fisiológica de la planta.

Análisis de Componentes Principales (ACP)

Se aplicó el ACP con el fin de reducir las dimensiones del conjunto de datos conformado por los parámetros morfoanatómicos y los valores de REO estimados para cada grupo estudiado. Esto abre la oportunidad de conocer el comportamiento de las diferentes observaciones en términos de Componentes Principales (CPs). En la figura 6 se tiene la correspondiente gráfica de puntajes o “scores”.

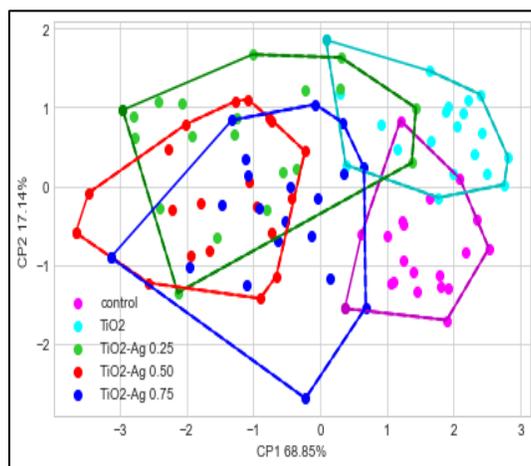


Fig. 6. Distribución de las observaciones en términos de las CP1 (68.85%) y CP2 (17.14%).

En la figura 6 se observa que las CPs principales 1 y 2 son las que contienen la mayor parte de la información del conjunto de datos originales, concentrándose en estas el 85,99 % de dicha información. La CP1 se asocia con la cantidad de Ag en las NPs de TiO₂ con las que se trataron las plantas y CP2 puede estar relacionada con otras variables como la edad, el estrés de la planta debido al tratamiento y el sellado de la celda fotoacústica al hacer la medición. Igualmente, se puede observar ciertas tendencias entre algunos grupos; por ejemplo, la mayor parte de las observaciones del grupo control se agrupan en una región diferente que la mayor parte de las observaciones del grupo TiO₂ – Ag0.25%. Lo mismo ocurre entre el grupo control y TiO₂ – Ag0.50%.

CONCLUSIONES

Las NPs de TiO₂ con Ag incorporada, usadas en este trabajo, dieron lugar a un aumento hasta del 53 % de la altura de las plantas en comparación con el grupo control. Esto indica que las NPs inoculadas en las semillas tienen un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de espinaca.

Por medio de la técnica FA se midió la REO de las plantas de espinaca bajo el efecto de la inoculación de las semillas con las NPs. A través del análisis de varianza y de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey se determinó que existe diferencia significativa en el comportamiento de este parámetro, asociada con la aplicación de las NPs de TiO₂ con Ag incorporada. Sin embargo, la cantidad de Ag incorporada en el TiO₂ marcó diferencias significativas únicamente para los valores extremos, es decir entre los tratamientos con TiO₂-Ag 0,25% y TiO₂-Ag 0,75%. Esto podría estar relacionado con el estrés causado por los tratamientos con mayor contenido de Ag.

La reducción de la dimensión del conjunto de datos a través del Análisis de Componentes Principales llevó a encontrar que la primera componente, relacionada con el porcentaje de plata adicionada a las NPs de TiO₂, y la segunda, posiblemente asociada a factores aleatorios como el ruido, que normalmente puede tener la medición, y características propias del metabolismo de cada individuo analizado, representan el 85,19 % de la información contenida en el conjunto de datos original. En la gráfica de “scores” se visualiza la agrupación de las correspondientes nubes de puntos, lo que corrobora la diferencia en el efecto debido a la aplicación de las NPs.

BIBLIOGRAFÍA

- Alejandro, P. D. L., & Rubiales, D. (2009). Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Management Science*, 65(5), 540–545. <https://doi.org/10.1002/ps.1732>
- Alharby, H.F., Metwali, E.M., Fuller, M.P. y Aldhebiani, A.Y. (2016). Impact of application of zinc oxide nanoparticles on callus induction, plant regeneration, element content and antioxidant enzyme activity in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under salt stress. *Archives of Biological Sciences*, 7(1):17-17. <https://doi.org/10.2298/abs151105017a>
- Andrea, M., Urbano, V., Fernández, Y. O., Mosquera, P., Enrique, J., & Páez, R. (2011). Nanopartículas de TiO₂, fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos. *Ingeniería y Desarrollo*, 29(2), 186–201.
- Asli, S., & Neumann, P. M. (2009). Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell and Environment*, 32(5), 577–584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01952.x>
- Boghossian, A. A., Sen, F., Gibbons, B. M., Sen, S., Faltermeier, S. M., Giraldo, J. P., Zhang, C. T., Zhang, J., Heller, D. A., & Strano, M. S. (2013). Application of nanoparticle antioxidants to enable hyperstable chloroplasts for solar energy harvesting. *Advanced Energy Materials*, 3(7), 881–893. <https://doi.org/10.1002/aenm.201201014>

- Capaldi Arruda, S. C., Diniz Silva, A. L., Moretto Galazzi, R., Antunes Azevedo, R., & Zezzi Arruda, M. A. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, *131*, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>
- Cargnello, M., Gordon, T. R., & Murray, C. B. (2014). Solution-phase synthesis of titanium dioxide nanoparticles and nanocrystals. *Chemical Reviews*, *114*(19), 9319–9345. <https://doi.org/10.1021/cr500170p>
- Elahi, E., Khalid, Z., Tauni, M. Z., Zhang, H., & Lirong, X. (2021). Extreme weather events risk to crop-production and the adaptation of innovative management strategies to mitigate the risk: A retrospective survey of rural Punjab, Pakistan. *Technovation*, 102255. <https://doi.org/10.1016/j.technovation.2021.102255>
- Favell, D. J. (1998). A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, *62*(1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00165-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00165-9)
- Gordillo Delgado, F., Zuluaga Acosta, J., & Marín Gallego, B. J. (2019). Inoculación De Nanopartículas De TiO₂-Ag En Semillas De Espinaca. *Informador Técnico*, *83*(1), 90–99. <https://doi.org/10.23850/22565035.1659>
- Jampilek, J., & Král'ová, K. (2015). Application of Nanotechnology in Agriculture and Food Industry, Its Prospects and Risks. *Ecological Chemistry and Engineering S*, *22*(3), 321–361. <https://doi.org/10.1515/eces-2015-0018>
- Kaiba, A., Ouerghi, O., Geesi, M. H., Elsanousi, A., Belkacem, A., Dehbi, O., Alharthi, A. I., Alotaibi, M. A., & Riadi, Y. (2020). Characterization and catalytic performance of Ni-Doped TiO₂ as a potential heterogeneous nanocatalyst for the preparation of substituted pyridopyrimidines. *Journal of Molecular Structure*, *1203*(xxxx), 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127376>
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., & Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, *3*(10), 3221–3227. <https://doi.org/10.1021/nn900887m>
- Liu, G., Lu, Z., Zhu, X., Du, X., Hu, J., Chang, S., Li, X., & Liu, Y. (2019). Facile in-situ growth of Ag/TiO₂ nanoparticles on polydopamine modified bamboo with excellent mildew-proofing. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53001-y>
- Menéndez Rodríguez, V. (2012). Bases fisiológicas y moleculares de la reproducción sexual y asexual en el gametofito de helechos.
- Mesci-Haftaci, S., Ankarali, H., Caglar, M., & Yavuzcan, A. (2014). Reliability of colposcopy in Turkey: Correlation with pap smear and 1-year follow up. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(17), 7317–7320. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.17.7317>
- Nuruzzaman, M., Rahman, M. M., Liu, Y., & Naidu, R. (2016). Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(7), 1447–1483. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05214>
- Olejnik, M., Krajnik, B., Kowalska, D., Twardowska, M., Czechowski, N., Hofmann, E., & MacKowski, S. (2013). Imaging of fluorescence enhancement in photosynthetic complexes coupled to silver nanowires. *Applied Physics Letters*, *102*(8), 1–6. <https://doi.org/10.1063/1.4794171>
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Raja Reddy, K., Sreepasad, T. S., Sajanlal, P. R., & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the

- germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 905–927.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>
- Rai, M., & Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3969-4>
- Rehman, H. ur, Aziz, T., Farooq, M., Wakeel, A., & Rengel, Z. (2012). Zinc nutrition in rice production systems: A review. *Plant and Soil*, 361(1–2), 203–226. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1346-9>
- Saavedra Del Real, G. (2013). Introducción a la producción de hortalizas. In *Fao*.
- Schwabe, F., Schulin, R., Limbach, L. K., Stark, W., Bürge, D., & Nowack, B. (2013). Influence of two types of organic matter on interaction of CeO₂ nanoparticles with plants in hydroponic culture. *Chemosphere*, 91(4), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.025>
- Shyla, K. Natarajan, N. (2014). Customizing zinc oxide, silver and titanium dioxide nanoparticles for enhancing groundnut seed quality. *Indian Journal of Science and Technology*, 7(2014/01/01), 1376–1381. <https://doi.org/DOI:10.17485/ijst/2014/v7i9/50905>
- Siddiqui, M. H., Al-Wahaibi, M. H., & Mohammad, F. (2015). Nanotechnology and plant sciences: Nanoparticles and their impact on plants. *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants*, 1–303. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0>
- Srilatha, B. (2011). Nanotechnology in agriculture. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 2(7).
<https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000123>
- Surya, C., Agnel Arul John, N., Pandiyan, V., Amutha, P., Sobral, A. J. F. do N., & Krishnakumar, B. (2019). Antioxidant (in vitro), Antidiabetic (in vitro) and Photocatalytic Activity of Costus speciosus Leaf Extract Assisted CS-Ag-TiO₂ Composites. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 11(3), 197–209. <https://doi.org/10.1007/s13530-019-0404-6>
- Zhang, P., Ma, Y., Zhang, Z., He, X., Zhang, J., Guo, Z., Tai, R., Zhao, Y., & Chai, Z. (2012). Biotransformation of ceria nanoparticles in cucumber plants. *ACS Nano*, 6(11), 9943–9950.
<https://doi.org/10.1021/nn303543n>



This is to certify that

Daniel Felipe Casas

Has presented a paper titled

Efecto del suministro de nanopartículas de dióxido de titanio incorporadas con plata en cultivo de espinaca (Spinacia oleracea L)

at the **Virtual Symposium in Plant Omics Science**

Held between November 23rd - 27th, 2020 at Santiago de Cali, Colombia

Andrés Jaramillo Botero
Scientific Director

Jaime Aguilar
Institutional Strengthening Sub-director

Support:





This is to certify that

Didier García

Has presented a paper titled

Monitoreo de la razón de evolución de oxígeno y tasa de crecimiento de tres variedades de arroz (oryza sativa) con alto potencial de rendimiento y adaptabilidad
at the **Virtual Symposium in Plant Omics Science**

Held between November 23rd - 27th, 2020 at Santiago de Cali, Colombia

Andrés Jaramillo Botero
Scientific Director

Jaime Aguilar
Institutional Strengthening Sub-director

Support:

