



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES (IIAF)
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación del desarrollo de *Zea mays* a través de
la fotosíntesis mediante la aplicación de
nanopartículas de óxido de zinc**

TESIS

para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta

Lic. Neftali Rangel García

Director de tesis:

Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno

Codirector de tesis: Dr. Dirhendra Kumar Tiwari



Morelia, Michoacán, junio de 2024

El presente trabajo de investigación plasmado en esta tesis se llevó a cabo durante el periodo de septiembre 2022 - mayo 2024 en el Laboratorio de Interacción Suelo Planta Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica y con el apoyo de El Colegio de Michoacán (COLMICH), LADIPA-CONAHCYT (CB 2017 2018/A1-S-47641).



EL COLEGIO
DE MICHOACÁN



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Agradecimientos

Agradecimientos.

Dr. Javier., Me ha acogido desde muy joven, ha respetado mis ideas y me ha dado un lugar para conocer gente que aprecie, aprender cosas que ignora y descubrir a donde quiero llegar. Muchas
Gladysola., Tú estás conmigo desde hace 6 años, y todos los días aprendí algo nuevo de ti, como ser un profesional, como ser un estudiante, como ser un amigo, como seguir peleando, ¡El canto de los gorriones, que cantan porque son libres, dan clases en mis balcones! gracias.

U.M.S.N.H., Gracias por adoptarme como segunda cada tantos años. Pis-pas, pis-pas, calis calás, calis calás, shhh, ¡pummm!., ¡San Nicolás!

Conahcyt, Colmich., Este proyecto se podría haber llevado a cabo sin su apoyo, Gracias.

A mi madre y mi padre., (R y R) compartan un abrazo conmigo cada que nos quedemos sin palabras, en lo bueno y lo triste, mil gracias por cada te quiero que me han dicho y mil más por cada vez que tuvieron que tolerar mi desconsideración. Gracias infinitas y vida eterna en mi corazón.

A mi hermana., (R) Gracias por darme el regalo más bello de la vida, cuídalo mucho, cuida su felicidad dale apoyo como a mí, y seguro llegara a la luna o a china, que el decida, para ustedes, mi gratitud y amor eterno.

Carla., Gracias por ayudarme con mi vida, mi carrera, mi maestría, mi día a día, te estaré agradecido eternamente estes donde estes. Espero no te canses pronto y espero me dejes estar para ti y apoyarte de la misma manera. (-) * (-) = +.

A mis compañeros de laboratorio., (M, D, N, A) estamos en el mismo barco, y todos trabajamos para sacarlo a flote, gracias por todo. Aquí sigo para ustedes.

A mis amigos más vetustos., (A, C, R, D) Gracias por ayudarme cada que tenía ganas de abandonar lo que quiero, por decirme la verdad, cruda y con amor. Gracias por ser como son.

A mis amigos de la carrera., (S, D) Nunca se han ido, y siempre tiene algo conque apoyarme, sigan siendo grandes, sigan siendo ustedes.

Dedicatoria

Para todos los que amo, siempre los llevo conmigo.

*“El aumento constante de entropía
es la ley básica del universo, y al igual que eso,
luchar contra la entropía es también
la ley básica de la vida.”*

V. Havel

ÍNDICE DE CONTENIDO.

Agradecimientos	iii
Dedicatoria.....	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
1.1 El maíz en México	3
1.2 Factores que regulan el desarrollo vegetal	4
1.2.1 Importancia del zinc en el desarrollo vegetal	4
1.3 Fotosíntesis	5
1.3.1 Fase lumínica de la fotosíntesis	5
1.3.2 Fase oscura o Ciclo de Calvin	7
1.4 Participación del zinc en la fotosíntesis	8
1.5 Nanopartículas en el desarrollo vegetal	9
1.6 Efecto de las nanopartículas en la fotosíntesis	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPOTESIS	14
4. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15
5. MATERIAL Y MÉTODOS	16
5.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc	16
5.1.1 Caracterización de nanopartículas de ZnO	17
5.2 Establecimiento de bioensayos dosis respuesta de maíz para evaluar el efecto de las NPs sobre el desarrollo vegetal y fotosíntesis	20
5.2.1 Preparación de soluciones stock de nanopartículas	20
5.3 Bioensayos <i>in vitro</i> de <i>Zea mays</i> con nanopartículas	20
5.3.1 Impregnado de semillas con nanopartículas de ZnO	20
5.3.2 Bioensayos <i>in vitro</i> de <i>Zea mays</i> con nanopartículas de ZnO	21
5.3.3 Bioensayos de maíz con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón	22
5.3.4 Actividad fotosintética de maíz cultivado con zinc nanoestructurado y zinc convencional	23
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	25

6.1 Variables respuesta	26
6.2 Análisis estadístico.....	26
7. RESULTADOS	27
7.1 Caracterización de las nanopartículas de ZnO	27
7.1.1 Análisis de nanopartículas de ZnO por espectroscopía de difracción de rayos X.....	27
7.1.2 Análisis de NPsZnO por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	28
7.1.3 Análisis de nanopartículas de ZnO por espectroscopia Raman	29
7.1.4 Análisis de nanopartículas de ZnO por espectroscopía infrarroja por transformación de Fourier (FTIR)	30
7.2 Bioensayos de <i>Zea mays</i> con nanopartículas de ZnO.....	32
7.2.1 Análisis elemental en semillas de maíz previamente a su siembra.....	32
7.3 Germinación de semillas de maíz impregnadas con zinc convencional o con nanopartículas de ZnO en bioensayos <i>in vitro</i>	34
7.4 Germinación de semillas de maíz suplementadas con zinc convencional o nanopartículas de ZnO 24 h suplementadas en el momento de la siembra en condiciones <i>in vitro</i>	36
7.5 Germinación de semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO en bioensayos en fitotrón.....	38
7.6 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre la altura de maíz en estadio de plántula	40
7.7 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre parámetros fotosintéticos en plántulas de maíz.....	44
7.8 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre la arquitectura radical en plántulas de maíz.....	50
7.9 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre la biomasa en plántulas de maíz .	56
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIÓN	65
10. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	67

Figura 1. Fase luminosa. Fotosíntesis en plantas.	6
Figura 2. Fase Oscura o Ciclo de Calvin.	8
Figura 3. Síntesis de nanopartículas.	17
Figura 4. Determinación de FWHM	18
Figura 5. Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc.....	19
Figura 6. Diagrama preparación de semillas de maíz.	21
Figura 7. Diagrama bioensayo in vitro	22
Figura 8. Bioensayos de maíz con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón	24
Figura 9. Espectro de difracción de rayos X de las nanopartículas de ZnO.	27
Figura 10. Micrografías de nanopartículas de ZnO obtenidas por microscopía electrónica de barrido.....	28
Figura 11. Micrografía electrónica de barrido de las nanopartículas de ZnO obtenidas por método sol-gel en aumento de 60K	29
Figura 12. Espectro Raman de las nanopartículas de ZnO	30
Figura 13. Espectroscopia FTIR de las nanopartículas de ZnO.....	31
Figura 14. Zinc en semillas de maíz después de 24h en contacto con Zn convencional o nanoestructurado	32
Figura 15. Macronutrientes detectados en semilla de maíz después de 24h en contacto con Zn convencional o nanoestructurado.	33
Figura 16. Germinación de semillas de maíz impregnadas durante 24 h con nanopartículas de ZnO ensayo in vitro	35
Figura 17. Semillas de maíz día de la siembra.	35
Figura 18. Semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional dos días después de su siembra.....	35
Figura 19. Semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional 5 días después de su siembra.	36
Figura 20. Germinación de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de ZnO al momento de la siembra en bioensayo in vitro	37
Figura 21. Semillas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional al momento de la siembra, dos días después de la siembra.....	37
Figura 22. Semillas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional 5 días después de la siembra.	38
Figura 23. Germinación de semillas de maíz impregnadas durante 24 h en fitotrón.....	39
Figura 24. Germinación de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de ZnO al momento de la siembra en condiciones de fitotrón..	39
Figura 25. Longitud del tallo de plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra.	41
Figura 26. Plántulas de maíz que fueron impregnadas con NPsZnO previamente a su siembra, crecimiento a 21 días después de su siembra.....	42
Figura 27. Plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO suplementadas al momento de la siembra, crecimiento 21 días después de su siembra.....	43
Figura 28. Phi2 en plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra.....	45
Figura 29. Clorofila "A" en plantas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO 21 días después de la siembra	46

Figura 30. Clorofila “B” en plantas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO 21 después de la siembra	47
Figura 31. Clorofila total en plantas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO 21 después de la siembra	48
Figura 32. Clorofila “A” en plantas de maíz con nanopartículas de ZnO agregadas en siembra 21 después de ser sembradas.....	48
Figura 33. Clorofila “B” en plantas de maíz con nanopartículas de ZnO agregadas en siembra 21 después de ser sembradas.....	49
Figura 34. Clorofila total en plantas de maíz con nanopartículas de ZnO agregadas en siembra 21 después de ser sembradas.....	50
Figura 35. Longitud radial en plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra.....	51
Figura 36. Número de raíces secundarias en plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra.....	53
Figura 37. Plantas de maíz con NPsZnO de 21 días después de la siembra. Método de impregnado, concentraciones en los recuadros negros. (+) tratamiento con zinc convencional ZnSO ₄ 0.86g/mL, (-) tratamiento sin zinc.....	54
Figura 38. Plantas de maíz con NPsZnO de 21 días después de la siembra. Método de agregado en siembra. Concentraciones en los recuadros negros. (+) tratamiento con zinc convencional (-) tratamiento sin zinc.....	55
Figura 39. Peso fresco en plantas de maíz con NPsZnO 21 días después de la siembra	57
Figura 40. Peso seco obtenido en plantas de maíz 21 días después de la siembra.....	59
Figura 41. Cuantificación de Zinc en plántulas de maíz	60
Figura 42. Determinación de FWHM.	73

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Tratamientos 25

Tabla de acrónimos

Acrónimo	Significado
ATP	Adenosín-Trifosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NTC	Nanotubos de Carbono
MWNTC's	Nanotubos de carbono de pared múltiple

RESUMEN

En este trabajo de tesis, se investigó la síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) mediante el método sol-gel como este mostraba efectos sobre el crecimiento de *Zea mays* desde etapas tempranas de su desarrollo. Las NPsZnO se caracterizaron mediante DRX, SEM, espectroscopia Raman y FT-IR, obteniendo un tamaño promedio de 20.903 nm y una morfología semi ovalada con porosidad diversa.

Mediante las nanopartículas se impregnaron semillas de *Zea may* en diversas concentraciones (1-256 $\mu\text{g/mL}$), se evaluó su germinación, fotosíntesis y biomarcadores de crecimiento. Se demostró que en concentraciones de 16-32 $\mu\text{g/mL}$ la germinación mejoro significativamente, así como la actividad fotosintética, también se incrementaron los niveles de clorofila, biomasa vegetal, área foliar y radical por su parte concentraciones arriba de 128 $\mu\text{g/mL}$ mostraron efectos tóxicos.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios publicados que muestran beneficios, así como riesgos del uso de nanopartículas en la agricultura. Por lo que se necesita un manejo cuidadoso de NPsZnO para explotar sus beneficios en la mejora del crecimiento vegetal y disminuir efectos adversos.

Palabras clave: Nanopartículas- Óxido de zinc- Método sol-gel- *Zea mays*- Germinación.

ABSTRACT

In this thesis work, the synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) were investigated using the sol-gel method, as this method showed effects on the growth of *Zea mays* from the early stages of development. The ZnO NPs were characterized using XRD, SEM, Raman spectroscopy, and FT-IR, obtaining an average size of 20.903 nm and a semi-oval morphology with diverse porosity.

Seeds of *Zea mays* were impregnated with the nanoparticles at various concentrations (1-256 µg/mL), and their germination, photosynthesis, and growth biomarkers were evaluated. It was demonstrated that at concentrations of 16-32 µg/mL, germination significantly improved, as did photosynthetic activity. Chlorophyll levels, plant biomass, leaf area, and root biomass also increased, whereas concentrations above 128 µg/mL showed toxic effects.

The obtained results are consistent with published studies that show both the benefits and risks of using nanoparticles in agriculture. Therefore, careful management of ZnO NPs is needed to exploit their benefits in enhancing plant growth while minimizing adverse effects.

Key words: Nanoparticles- Zinc oxide- Sol-gel method- *Zea mays*- Germination.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 El maíz en México

El maíz (*Zea mays*), es el cereal por excelencia en la cultura del centro del continente americano. El valor sociocultural le ha generado un papel de alta importancia en la soberanía y seguridad alimentaria, esto lo hace un cultivo fundamental especialmente en zonas rurales de México. precisan cómo el cereal se domesticó en la época prehispánica y se convirtió en un pilar de la gastronomía y la alimentación mexicana. Se estima que se consumen ~100 kg de maíz per cápita por año en México (SIAP, 2021)

México se posiciona en 8° lugar en producción de maíz, en 2017 exportó a 17 países, Venezuela (58%), Kenia (33%) y Estados Unidos (4%) fueron los destinos más importantes (SIAP, 2017). La producción de maíz en 2021 fue de 28.43 toneladas, con un crecimiento del 2.6% respecto al 2021. El maíz blanco representó 24.75 toneladas con un incremento del 0.5%, mientras que la producción de maíz amarillo aumentó un 11.7%, alcanzando un total de 3.36 toneladas. Sin embargo, la disponibilidad del producto y los precios internacionales generaron un incremento en el precio del grano (SIAP, 2021).

El maíz también es relevante en la rotación de cultivos, dado que los residuos vegetales son de descomposición lenta, esto promueve la acumulación de materia orgánica y mejora la estructura del suelo, mejorando el intercambio gaseoso, el incremento radical y la infiltración de agua (Masci et al., 2020).

Debido a la importancia de este cultivo, para cubrir la demanda para la población, en la agricultura intensiva, se emplea la fertilización química para suplementar los macro y micronutrientes. Sin embargo, el uso excesivo de estos insumos ha generado daños ambientales significativos, desde la contaminación del suelo y mantos acuíferos hasta la alteración de las poblaciones microbianas nativas. La aplicación desmedida de fertilizantes químicos ha generado además importantes pérdidas económicas (Lira-Saldivar et al., 2018).

1.2 Factores que regulan el desarrollo vegetal

El crecimiento y desarrollo vegetal es un proceso muy complejo coordinado por diversos factores bióticos y abióticos, como luz, temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes en suelo. Para resolver el déficit de nutrientes, estos suelen suplementarse de manera exógena, principalmente los macronutrientes como el fósforo o el nitrógeno, pero también micronutrientes como el zinc, siendo este último uno de los micronutrientes más deficientes en suelos, añadiéndose típicamente en forma de sulfatos (Kirby & Romhel, 2008), dado que la deficiencia de micronutrientes resulta en alteraciones morfo-fisiológicas afectando la producción del cultivo.

1.2.1 Importancia del zinc en el desarrollo vegetal

El zinc (Zn) es un micronutriente esencial en plantas, y tiene un papel crítico en su metabolismo, así como en las respuestas al estrés (Samreen et al., 2017). Se necesitan ~15-20 mg/kg en tejido seco para obtener un funcionamiento metabólico adecuado, esto es aproximadamente el 0.1% del peso seco total en el tejido vegetal. El zinc es necesario para el metabolismo de carbohidratos y funciona como cofactor en diversas enzimas fotosintéticas, antioxidantes e incluso en la síntesis de proteínas (Guil Guerrero et al., 1998).

En plantas, el Zn también regula indirectamente el desarrollo vegetal a través de la homeostasis de fitohormonas derivadas de aminoácidos como el triptófano, fundamental para la síntesis de auxinas como el ácido indol-3-acético (Eide, 2011., Escudero-Almanza et al., 2015). El zinc está presente en forma de Zn^{2+} en los sistemas vegetales y tiene propiedades nucleofílicas, esto lo ayuda a reaccionar con múltiples moléculas, como agua y CO_2 . Esto se observa en algunas funciones como la de catalizador en enzimas como la anhidrasa carbónica, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa (Chong & Auld, 2007).

La cantidad adecuada de Zn es esencial para que se mantenga activo el fotosistema II durante la fotosíntesis. Cuando existe una deficiencia de Zn, se suelen desarrollar manchas cloróticas en las hojas, debido a la falta de clorofila y posteriormente la necrosis o muerte celular (Amezcuca & Lara, 2017).

1.3 Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso biológico más importante en el planeta tierra, es llevado a cabo por las plantas, algas y cianobacterias. De acuerdo con Carril (2011), se conocen 3 tipos de fototrofías: fototrofia basada en rodopsina, fotosíntesis anoxigénica y fotosíntesis oxigénica, siendo esta última, la que cambió la forma de vida en el planeta, al ser el proceso mediante el cual se lleva a cabo la fijación de dióxido de carbono (CO_2) y la liberación de O_2 (Taiz & Zeiger, 2003).

La fotosíntesis se ha dividido en 2 etapas: la fase lumínica y la fase oscura. La fase luminosa, llamada así porque necesita de la captación de fotones como iniciadores del proceso, es también llamada fase energética, pues el fin de esta es obtener moléculas energéticas como el Adenosín-Trifosfato (ATP) y poder reductor de moléculas como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), así como O_2 (Taiz & Zeiger, 2003). Mientras que, durante la fase oscura o biosintética de la fotosíntesis, se usan las moléculas energéticas generadas durante la fase I, para sintetizar como resultado final moléculas de glucosa a partir de la fijación de CO_2 (Taiz & Zeiger, 2003).

1.3.1 Fase lumínica de la fotosíntesis

La fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos de algas y plantas. Por cada célula vegetal, se llegan a encontrar hasta 100 cloroplastos, estos son uno de los tres plastidios existentes. Dentro del cloroplasto se encuentra una alta concentración de clorofilas, pigmentos que absorben luz y son pilares de la fotosíntesis (Rakesh Kumar et al., 2017). Los cloroplastos tienen una estructura compleja, que contiene dos membranas fosfolipídicas (interna y externa) con un espacio intermembranas en ellas. El interior del cloroplasto contiene un líquido acuoso denominado estroma en el cual se encuentran pilas de tilacoides llamadas granas. Los tilacoides tienen forma de plato plano y se delimitan por otra membrana que se conoce como espacio tilacoidal. En los tilacoides, encontramos complejos proteicos de tipo transmembranal llamados fotosistemas, puntualmente el fotosistema II (PSII) y el Fotosistema I (PSI). Estos fotosistemas son esenciales para la captura y conversión de energía lumínica en energía química (Mcfadden, 2001).

La fotosíntesis es un proceso que usa la luz como motor de arranque, es decir, la absorción de la luz se lleva a cabo por pigmentos (clorofilas) que encontramos en el fotosistema II (PSII o P₆₈₀), mediante resonancia las clorofilas encontradas en el fotosistema llevan la energía hasta la clorofila diana o centro de reacción que tiene una longitud de onda de 680 ($\lambda = 680 \text{ nm}$).

La fotosíntesis inicia con la absorción de luz por las clorofilas del PSII, que luego transmiten energía hasta una clorofila diana o también llamado centro de reacción que tiene una longitud de onda de 680 nm. Esta energía capturada por el PSII genera la fotólisis de agua, generándose como subproductos oxígeno y protones (Purves et al., 2003).

Los electrones que se liberan en la fotólisis del agua se transfieren mediante una serie de transportadores hacia el PSI. En esta cadena de transporte, se generan moléculas energéticas como “NADHP” y “ATP”. Fundamentales para la siguiente etapa de la fotosíntesis. El PSI absorbe luz con una longitud de onda de 700 nm. Dando pie a que los electrones excitados sean utilizados para reducir el NDP⁺ a NADPH, otro importante portador de energía.

En el proceso se genera un gradiente de protones mediante la membrana tilacoidal, que se utilizan por una enzima llamada ATP sintasa para la síntesis de ATP, esta es la moneda energética de la célula (Taiz & Zeiger, 2003). En la figura 1, se muestra un esquema gráfico representativo de la fase lumínica de la fotosíntesis.

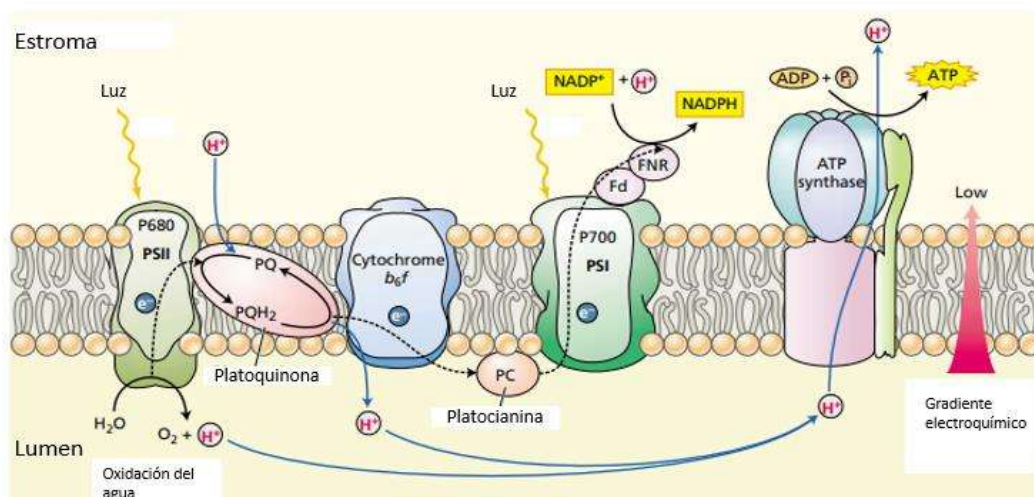


Figura 1. Fase luminosa. Fotosíntesis en plantas (Imagen recuperada Taiz & Zeiger, 2003).

1.3.2 Fase oscura o Ciclo de Calvin

El Ciclo de Calvin o fase oscura es una etapa crucial de la fotosíntesis en la cual son utilizadas las moléculas energéticas que se generaron en la fase lumínica, con el objetivo de fijar el CO₂ atmosférico y generar carbohidratos, este proceso se divide en tres fases.

La primera fase denominada, fase de fijación de carbono, en esta una molécula de CO₂ se junta con una molécula de 5 carbonos llamada Ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa-oxidasa (RuBisCo). De este proceso se obtienen dos moléculas de ácido-3-fosfoglicerol (3-PGA), moléculas que se utilizarán más adelante en el ciclo.

En la segunda fase, denominada reducción, las moléculas de 3-PGA se transforman en ATP y NADPH y junto con las obtenidas en la fase lumínica se transforman en gliceraldehido-3-fosfato (G3P).

La tercera fase, denominada de regeneración, une varias moléculas de G3P para formar glucosa. Las moléculas que sobran de G3P se regeneran en RuBisCo y este proceso también requiere de energía brindada por ATP de la fase lumínica.

En conjunto, estas tres fases conforman la denominada “fase oscura”, ya que se realiza continuamente y no necesita directamente una fuente de energía lumínica para su funcionamiento. Este ciclo es esencial para la producción de carbohidratos y desarrollo de las plantas (Taiz & Zeiger, 2003).

En la figura 2, se muestra un esquema gráfico representativo de la fase oscura de la fotosíntesis.

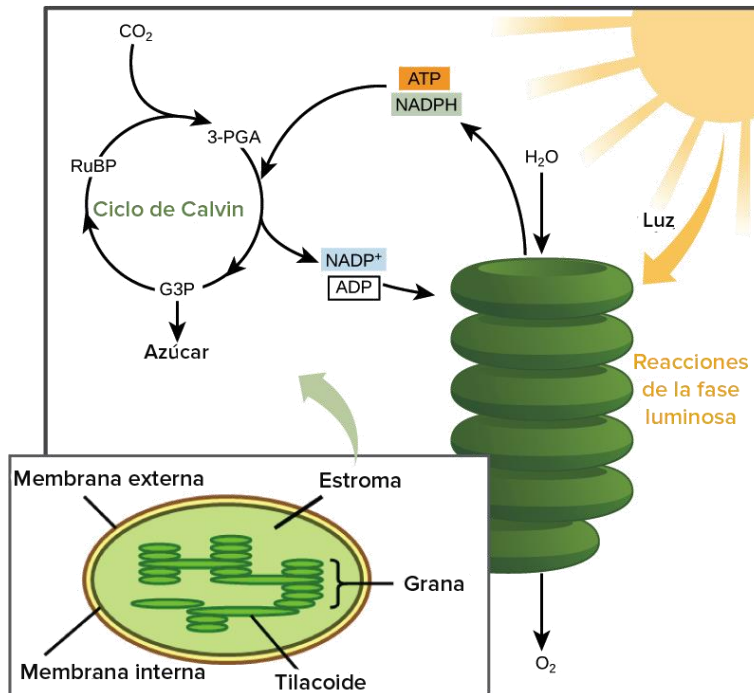


Figura 2. Fase Oscura o Ciclo de Calvin. (Imagen recuperada de *Khan Akademy* 2022).

1.4 Participación del zinc en la fotosíntesis

El zinc durante el proceso de la fotosíntesis juega un papel crítico, ya que participa en la activación de enzimas durante la síntesis de clorofila, el catabolismo de almidón en monosacáridos como la glucosa para la obtención de energía. Asimismo, durante la fase lumínica de la fotosíntesis, el zinc mantiene activo el fotosistema II (durante la fase lumínica). Durante el proceso de fotosíntesis, las hojas al estar expuestas a la luz generan altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS), la sobreacumulación de ROS puede dañar las clorofilas y los lípidos de las membranas, dando lugar a un rápido desarrollo de clorosis y necrosis en las plantas, sobre todo en días largos y con alta luminosidad, lo que colateralmente puede inducir apoptosis celular (Mendoza & Luis Rodríguez-López, 2007). Sin embargo, la disponibilidad de zinc ayuda a contrarrestar estos efectos negativos de las ROS en las células, ya que desempeña un papel clave para el funcionamiento de enzimas como la superóxido dismutasa, que ayuda a reducir los niveles altos de ROS en las células y evitar daño celular (Mendoza & Luis Rodríguez-López, 2007).

Por otro lado, en la fase oscura de la fotosíntesis, el zinc forma parte estructural de proteínas chaperonas, responsables de mantener la estructura tridimensional adecuada de la RuBisCO, responsable de la fijación del CO₂ atmosférico para la obtención de glucosa y energía para las plantas (Amezcuca & Lara, 2017). Además, activa a la enzima anhidrasa carbónica, responsable de incrementar la concentración de CO₂ dentro del cloroplasto para incrementar la tasa de carboxilación de la RuBisCO (Amezcuca & Lara, 2017). La fotosíntesis en plantas también ha demostrado tener un rol clave para la regulación de vías de señalización como la vía TOR (Target Of Rapamycin), esta vía converge en procesos celulares que regulan el crecimiento y desarrollo vegetal a través de la homeostasis de fitorreguladores, balance nutricional, respuesta al estrés biótico y abiótico, así como en el sistema antioxidante vegetal.

Por otro lado, se han estudiado alternativas que permitan mejorar el desarrollo y productividad de cultivos agrícolas como el maíz, haciendo más eficiente procesos claves del desarrollo vegetal como la fotosíntesis. En este sentido, la nanobiotecnología ha demostrado tener un impacto positivo para mejorar el desarrollo vegetal.

1.5 Nanopartículas en el desarrollo vegetal

Las nanopartículas (NPs) en las últimas décadas han sido de estudio en plantas con el fin de buscar alternativas para solucionar problemas de desabasto de algunos cultivos de interés agrícola, así como reducir el uso de insumos químicos que representan un problema grave de contaminación ambiental en la actualidad.

Se ha explorado el uso de múltiples tipos de nanopartículas en los cultivos vegetales, desde nanopartículas a base de carbono, así como nanopartículas metálicas, que poseen propiedades fisicoquímicas a las que se atribuyen sus efectos en la promoción del crecimiento vegetal. Existe un número importante de estudios previos que demuestran que el uso de nanopartículas orgánicas y metálicas mejora el desarrollo de cultivos vegetales. Entre las nanopartículas más ampliamente estudiadas en plantas a la fecha, se encuentran los nanotubos de carbono (NTC) de origen natural, sintéticos, de una sola capa o de pared múltiple,

dopados, etc., estos han sido de gran interés científico debido a los efectos positivos mostrados en el desarrollo vegetal, estos efectos se han atribuido en parte a la capacidad de estas nanopartículas para atravesar la membrana en las células vegetales, lo que facilita la entrega de compuestos importantes para las células (Srinivasan & Saraswathi, 2010). Por otro lado, se ha documentado que la aplicación de nanotubos de carbono de pared múltiple o Multi-walled Carbon nanotubes (MWNTC's) estimulan la germinación de semillas como *Zea mays* y *Hordeum vulgare* (Lahiani et al., 2013). En otro estudio se confirmó que los MWCNT oxidados generaron una mejora significativa en la elongación del sistema radicular, incremento del desarrollo de la parte aérea y al mismo tiempo en la promoción de la actividad enzimática en el sistema antioxidante en *Nicotiana tabacum* (Hao et al., 2018).

Además del uso de nanopartículas de naturaleza orgánica en los cultivos vegetales, también se estudia la aplicación de nanopartículas metálicas en beneficio de las plantas. Diversos autores han demostrado que estas nanopartículas metálicas han mejorado el desarrollo en distintos estadios del desarrollo de diversas especies vegetales. Estas investigaciones concluyen que la adición de estas nanopartículas mejora potencialmente el aprovechamiento de los nutrientes por la planta, reduciendo las cantidades de insumos de origen sintético y/o químico aplicado (Liu & Lal, 2015). Por ejemplo, en plantas de *Triticum* con la aplicación de nanopartículas de cobre se demostró un incremento del 25% en el rendimiento de esta planta, comparado con las plantas control (Batsmanova et al., 2013). Asimismo, se demostró una mejora en la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* con la aplicación de nanopartículas de óxido de silicio (Ronaldo Silva et al., 2019). También se documentó que semillas de *S. lycopersicum* incrementaron la actividad del sistema antioxidante en condiciones de estrés salino cuando fueron suplementadas con nanopartículas de silicio (Ronaldo Silva et al., 2019). Otras nanopartículas de origen metálico ampliamente estudiadas son las NPs de plata; se documentó que estas NPs en *Bacopa Monnieri* incrementaron la germinación y la tasa fotosintética en la etapa de madurez de esa planta, mientras que en *Phaseolus*

vulgaris mostraron un incremento en la raíz, la parte aérea y la tasa fotosintética (Krishnaraj et al, 2012).

1.6 Efecto de las nanopartículas en la fotosíntesis

El uso de nanopartículas en las plantas también ha demostrado tener efectos positivos y negativos sobre la maquinaria y eficiencia fotosintética, donde se ha observado que las NPs alteran la fluorescencia, rendimiento cuántico y otros factores, sin embargo, aún no es claro el papel de estos nanomateriales en dicho proceso, a pesar de que la fotosíntesis es el proceso clave en la vida de las plantas, al transformar la energía lumínica en energía química. Recientes reportes científicos han informado que los nanotubos de carbono que se adicionaron en cloroplastos aumentaron tres veces la actividad fotosintética en comparación con cloroplastos usados como testigos, además, se detectó un aumento en la tasa de transporte de electrones (Botero et al., 2014). Por otro lado, (Ronaldo Silva et al., 2019) mostraron que nanopartículas de silicio mesoporoso se unían al fotosistema II y se generó una actividad estable inducida por una reacción fotosintética, asimismo, los electrones impulsados por luz tenían la posibilidad de desarrollar fotosensores y sistemas fotosintéticos artificiales. La tasa fotosintética fue mejorada en otro estudio, como respuesta a la mejora y aumentos en pigmentos fotosintéticos, así como una mayor actividad de la anhidrasa carbónica con la aplicación de nanopartículas de óxido de silicio (shihan et al., 2012). Mientras que la aplicación de nano-anatasa de dióxido de titanio (TiO_2) demostró mejorar la asimilación del carbono fotosintético iniciando la actividad de la RuBisCo, lo que puede promover la carboxilación de la enzima (Yang et al., 2006). En 2007 (Lei et al., 2007) mostraron que la nano-anatasa TiO_2 tiene un perfil fotocatalizador y que mejoraba la absorbancia de luz, lo cual conllevaba a una mejor transformación de la energía luminosa. Estas nanopartículas también demostraron una protección antienvjecimiento de los cloroplastos (Yang et al., 2006). Otras investigaciones mostraron que la nano-anatasa promovió el transporte de electrones de cadena completa, fosforilación de la actividad de la clorofila en luz visible y ultravioleta, la actividad de fotorreducción del fotosistema II y la evolución del oxígeno molecular (Lei et al., 2007).

En 2007 se demostró que las nanopartículas metálicas inducen una mejora en la producción de energía química en sistemas fotosintéticos, esto debido a que la clorofila se une a nanocristales de oro y plata en el centro de reacción, lo que forma un sistema híbrido que genera 10 veces más electrones excitados, todo esto, por efecto plasmón (Govorov & Carmeli, 2007). El sistema antioxidante en las plantas está directamente relacionado con la fotosíntesis, ya que protege las células vegetales de los daños causados por los ROS que se generan durante este proceso. La fotosíntesis y el sistema antioxidante trabajan en conjunto para mantener la salud y el rendimiento de las plantas, especialmente en condiciones ambientales desafiantes, en este sentido, (Faizan et al., 2018) evaluaron el sistema antioxidante posterior a la aplicación de diversas concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc en plantas de Chile *Capsicum annuum*, en sus resultados mostraron que todos los tratamientos con nanopartículas tuvieron una mejor respuesta en los parámetros del sistema antioxidante, lo cual relacionaron al incremento en la mejora de factores fotosintéticos como el incremento en las concentraciones de clorofila.

2. JUSTIFICACIÓN

El sector agroalimentario utiliza aún tecnologías convencionales que presentan un desaprovechamiento de recursos, así como daños al medio ambiente al lixiviarse al suelo. Una de las alternativas como sustitutos del uso de agroquímicos es el uso de nanopartículas como el óxido de zinc (NPsZnO) nanoestructurado, que ha mostrado tener efectos positivos al desarrollo vegetal. Si bien, algunos trabajos pioneros han reportado algunos posibles mecanismos mediante los cuales las NPsZnO promueven el desarrollo vegetal, aún no es claro cuál es el papel que tienen en procesos como la fotosíntesis y procesos que en sinergia son clave en la regulación metabólica en todos los estadios de desarrollo vegetal. Por lo que, en este proyecto, se profundizará en el estudio de los efectos de las NPsZnO a nivel morfo-fisiológico y su participación en procesos como la fotosíntesis en *Zea mays*, una de las gramíneas de mayor importancia agroalimentaria.

3. HIPOTESIS

El zinc nanoestructurado mejora el desarrollo de *Zea mays* estimulando la actividad fotosintética comparado con la respuesta al zinc convencional.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto del zinc nanoestructurado en la estimulación del desarrollo de *Zea mays* mediante el incremento de la tasa fotosintética.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de óxido de zinc.
- Evaluar la absorción de zinc en semillas y plantas de *Zea mays*.
- Evaluar el efecto de las NPsZnO en la germinación de *Zea mays* con NpsZnO y zinc convencional en bioensayos dosis respuesta.
- Evaluar biomarcadores de crecimiento de *Zea mays* cultivado con NPsZnO. y zinc convencional en bioensayos dosis respuesta.
- Evaluar el efecto del NPsZnO y zinc convencional sobre la tasa fotosintética en plántulas de *Zea mays*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este proyecto de investigación se llevó a cabo la síntesis y caracterización de NPs de ZnO, posteriormente estas NPs se utilizaron para el establecimiento de bioensayos dosis respuesta de maíz suplementado con NPs ZnO o zinc convencional en condiciones *in vitro* y en fitotrón.

5.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc

Se sintetizaron las nanopartículas por método sol-gel. Para la obtención del “sol” como fuente de zinc o precursores se usaron 5 gramos de nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$), el cual fue agregado en 250 mL de agua destilada y estabilizado (450 rpm) y temperatura ambiente durante 5 minutos, mientras que como agente quelante se usaron 10 gramos de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) el cual se dejó estabilizar en 250 mL de agua destilada a (450 rpm) y temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente ambas soluciones fueron mezcladas (450 rpm) durante 30 minutos. Para la obtención del gel como agente precipitante y estabilizador se usaron 5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) el cual fue agregado por una técnica de goteo con intervalos de 10 segundos entre cada gota hasta terminar la solución, a una agitación constante (450 rpm) y una temperatura ambiente, una vez terminado el goteo se dejó estabilizar durante 30 minutos en agitación constante (450 rpm).

Posteriormente, esta solución se sometió a un proceso de evaporación y secado durante 24 horas en un horno a 100°C . Al obtener el sobrante se aforó a 100 mL y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos, posteriormente la muestra fue secada en horno a 80°C durante 24 horas. Para finalizar el proceso, la muestra se calcinó durante 60 minutos a 560°C en mufla y el residuo obtenido se pulverizó en mortero durante 25 minutos para unificar tamaño de agregados. En la figura 3 se muestra paso a paso el proceso de la síntesis.



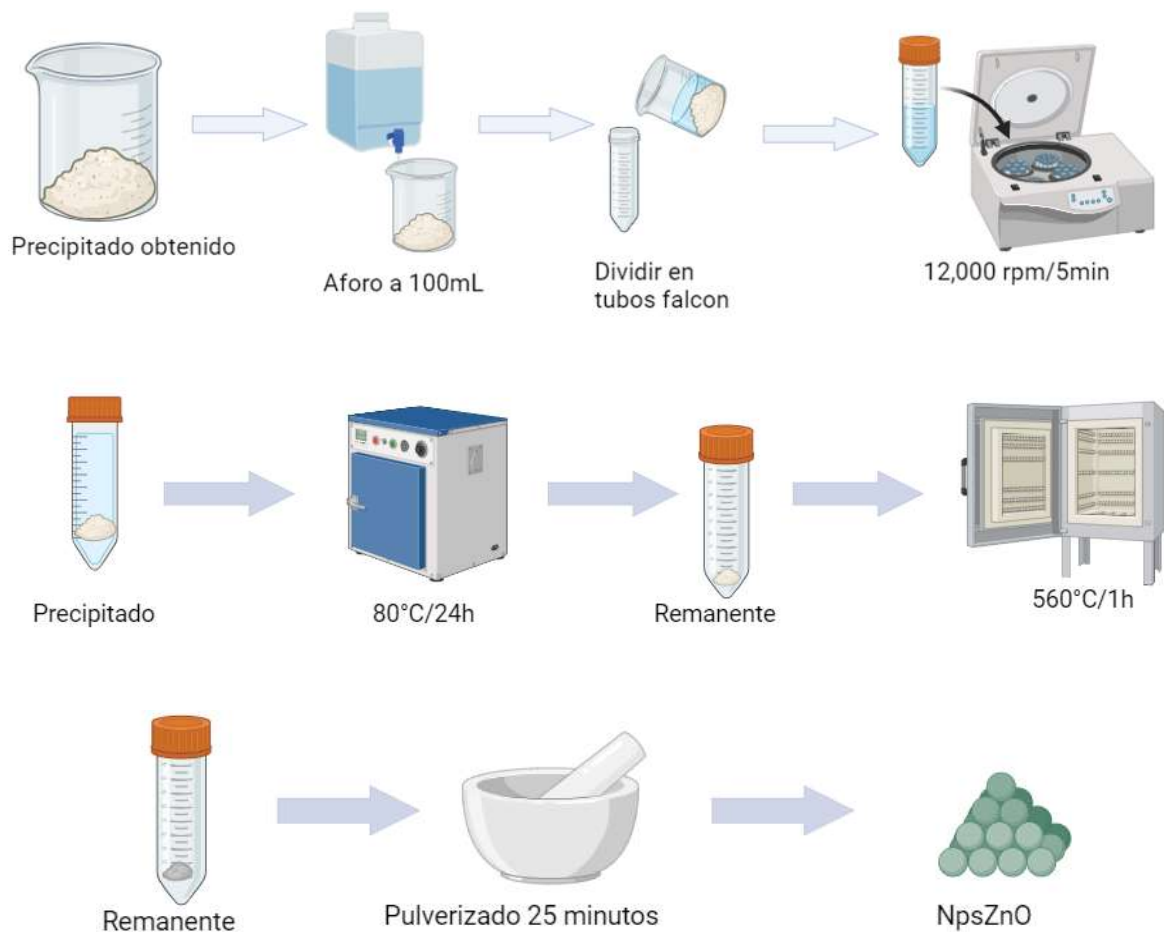


Figura 3. Síntesis de nanopartículas. Síntesis por método sol-gel.

5.1.1 Caracterización de nanopartículas de ZnO

Para conocer las propiedades de las NPsZnO obtenidas por sol-gel, se tomaron 0.1-0.5 gramos para su análisis por los siguientes métodos analíticos:

Difracción de rayos X (DRX): El análisis de la composición elemental se realizó por DRX, para ello se analizaron 0.1 gramos de NPsZnO, en una corrida de intensidad de 0 a 9000 (u.a.) sobre un intervalo de 0 a 70 en 2θ grados.

Asimismo, con los datos obtenidos mediante el análisis DRX se determinó el tamaño de cristalito de las NPs de ZnO, mediante el uso de la trigonometría y reflexión, mediante los ángulos que estas NPs presentan en su morfología. A continuación, se muestra un ejemplo para la obtención de este valor:

Partiendo de la siguiente fórmula:

$$\text{Tamaño del Cristalito (promedio en \AA)} = \frac{K\lambda}{B \cos \theta}$$

Donde:

- θ : La mitad del ángulo de Bragg (radianes).
- λ : Longitud de onda de los rayos x utilizados.
- K: Factor de forma adimensional, normalmente 0.9 (asume cristalitos esféricos) pero varía con la forma real del cristalito.
- B: Línea que se ensancha a la mitad de la intensidad máxima (FWHM), después de restar la línea instrumental que se ensancha.

Mientras que para calcular “FWHM” (Full Width at Half Maximum) se realiza mediante la siguiente evaluación en el espectro correspondiente, el cual se muestra en la figura 4:

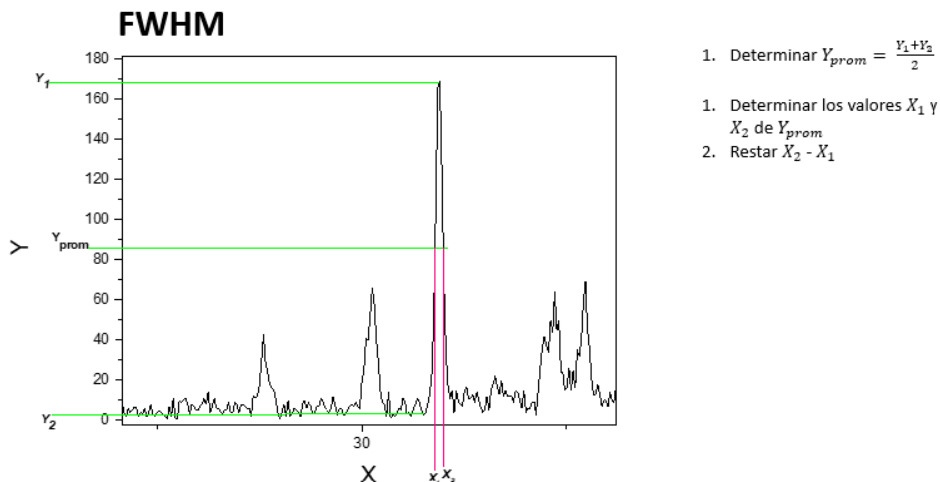


Figura 4. Determinación de FWHM. Espectro tomado como ejemplo para la obtención de los valores necesarios en FWHM que forman parte del cálculo para el tamaño de Cristalito

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Para evaluar las características morfológicas y tamaño de las NPsZnO, se tomaron 0.5 gramos de la muestra y se analizó mediante SEM, se observó la muestra a distintos aumentos: 5, 10, 20, 30 y 100K

Para determinar el tamaño de las nanopartículas se usó el programa ImageJ y se tomó una foto del óxido de zinc con un aumento de 60K (Figura 10) en el cual mediante un análisis de píxeles tomando como escala barra de 100 nm, se midieron

100 “esferas” reconocidas como nanopartículas, se tomó su radio y se determinó su área mediante la siguiente fórmula:

$$A = \pi * r^2$$

A= área

π = valor de Pi

r^2 = radio al cuadrado

Espectroscopía Raman: Para la obtención de la cristalinidad y la composición química se usaron ~0.1 gramos de muestra y se analizaron mediante espectroscopia Raman con una intensidad de 0-1700 (u.a.) sobre un desplazamiento Raman de 0 a 80 (s/cm).

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR): Por último, se analizó ~ 0.1gramos de nanopartículas de ZnO mediante FTIR, con una transmitancia de 0-100 sobre una frecuencia de onda de 0 a 3000 (s/cm), lo que permitió identificar los grupos funcionales característicos del ZnO. En la figura 5 se integran gráficamente los distintos métodos complementarios que permitieron hacer una caracterización integral de las NPs de ZnO obtenidas.

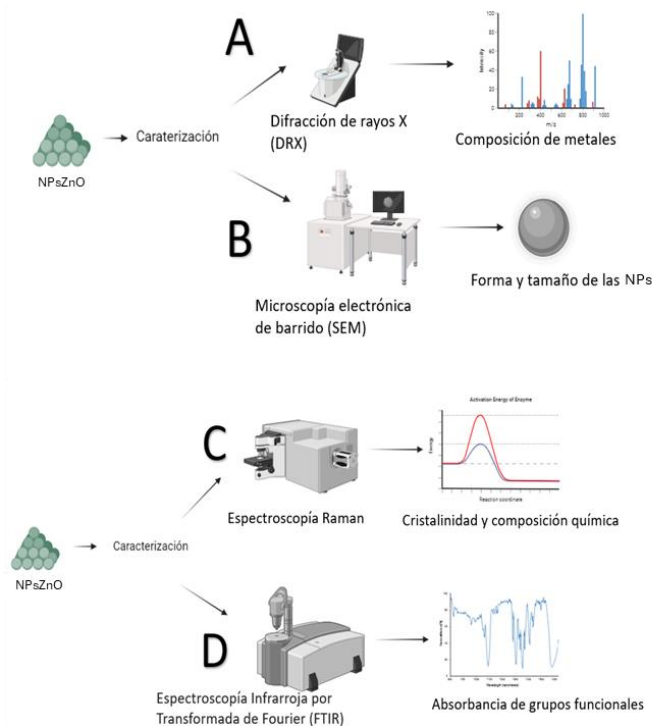


Figura 5. Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc

5.2 Establecimiento de bioensayos dosis respuesta de maíz para evaluar el efecto de las NPs sobre el desarrollo vegetal y fotosíntesis

Para evaluar el efecto de las NPs de ZnO sobre los biomarcadores de desarrollo de maíz se planteó la siembra de la semilla usando dos distintas metodologías:

Fase 1: Se expusieron las semillas (impregnado) durante 24 h a una solución con distintas concentraciones de nanopartículas de ZnO y posteriormente se procedió a la siembra de estas en agrolita.

Fase II: Las semillas se conservaron en agua destilada durante 24 h, posteriormente se agregaron las NPs y las semillas fueron sembradas.

5.2.1 Preparación de soluciones stock de nanopartículas

5.3 Bioensayos *in vitro* de *Zea mays* con nanopartículas

Se prepararon soluciones stock de nanopartículas de óxido de zinc a una concentración de 500 µg/mL, de la cual, se realizarán diluciones para obtener 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, y 256 µg/mL de NPs.

5.3.1 Impregnado de semillas con nanopartículas de ZnO

Para esta fase, las semillas de maíz fueron inmersas en 10 mL de las soluciones con NPs de óxido de zinc a las concentraciones señaladas en apartado 5.2.1, posteriormente se dejaron en reposo a temperatura ambiente 24 h.

De las semillas previamente impregnadas con las NPs, 25 semillas por tratamiento fueron secadas en horno a 60°C durante 3 horas, posteriormente fueron pulverizadas en molino orbital para y analizadas mediante fluorescencia de rayos X (FRX) para determinar el perfil mineral en las semillas previamente a la siembra, así como la cantidad de zinc absorbido en las semillas durante el proceso de inmersión, el procedimiento se esquematiza en la figura 6.

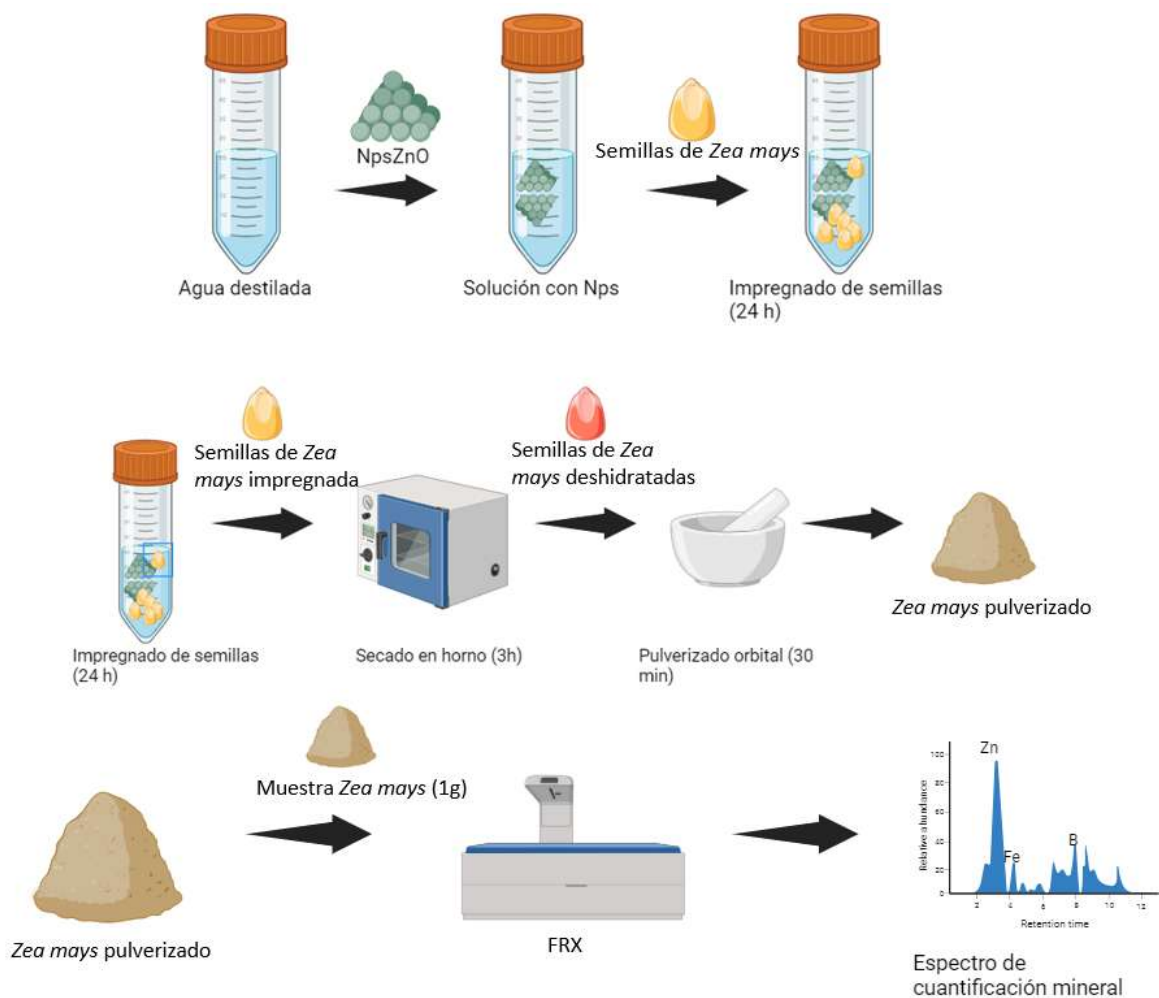


Figura 6. Diagrama preparación de semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO y análisis elemental en semillas mediante técnica de FRX.

5.3.2 Bioensayos *in vitro* de Zea mays con nanopartículas de ZnO

Para evaluar la germinación y el desarrollo de maíz suplementado con NPs de ZnO, se establecieron bioensayos dosis respuesta *in vitro* y en fitotrón (Figura 7 y 8) como se describe a continuación:

Para los bioensayos *in vitro* se sembraron las semillas con el tratamiento descrito en la figura 6. Para ello, se desinfectaron semillas de maíz con hipoclorito de sodio al 20% (v/v) durante 2 minutos y posteriormente enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril por intervalos de un minuto para eliminar residuos del hipoclorito; posteriormente se sembraron 30 semillas por tratamiento en medio agar-agua dispuesto en cajas magenta. Estas se dejaron a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) en

obscuridad y se evaluaron los cambios morfológicos en las semillas durante 7 días posteriores a la siembra y se evaluó el porcentaje y la velocidad de germinación (Figura 7).



Figura 7. Diagrama bioensayo in vitro. Evaluación de germinación de semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO.

5.3.3 Bioensayos de maíz con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón

La siembra de las semillas se realizó en contenedores de polietileno de 500mL con agrolita previamente esterilizada a 121°C/30 min, se sembraron 3 semillas por contenedor. Posteriormente se incubaron a 22°C y se mantuvieron en fitotrón. Después de la germinación las plántulas se irrigaron diariamente con agua destilada para mantener la humedad a capacidad de campo y cada 3 días se suministró una solución nutritiva completa para las plantas control, y para las plantas suplementadas con zinc nanoestructurado se agregó una solución sin zinc convencional. Las plántulas se cosecharon para su análisis 21 días después de su siembra, se eliminaron residuos de agrolita de la raíz y se analizó la arquitectura radical, para ello, se midió el tamaño de la raíz primaria, número de raíces secundarias y volumen radical con el software “WinRHIZO 2013 Basic, Reg, Pro & Arabidopsis For Root Measurement”.

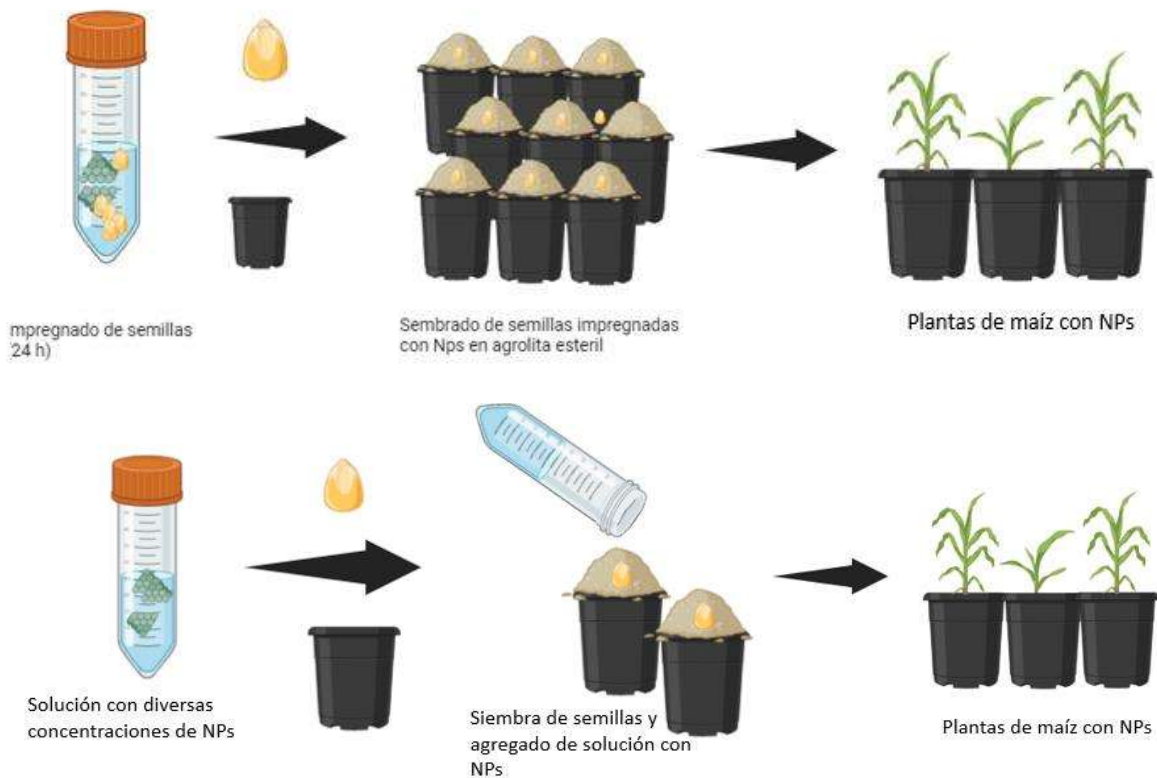
Para determinar el área foliar de las plántulas, se midió la longitud del tallo con vernier.

Para evaluar la biomasa vegetal, las plántulas fueron pesadas después de la cosecha, posteriormente se secaron en horno a 60°C durante 48h para eliminar el H₂O en el tejido vegetal, para después ser pesadas en balanza analítica.

5.3.4 Actividad fotosintética de maíz cultivado con zinc nanoestructurado y zinc convencional

El efecto de las NPs de ZnO sobre la actividad fotosintética, se utilizaron para el análisis pinzas para fotosíntesis, se obtuvieron valores de intercambio de gases, contenido de clorofila (SPAD), y el trabajo en el fotosistema II.

Para realizar la fase II, se desinfectaron las semillas de forma similar a la fase I, posteriormente se verbalizaron las semillas sumergiéndolas en agua destilada por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron las distintas concentraciones de NPs de ZnO como en la fase I y se sembraron las semillas. Se analizaron los mismos variables respuesta que en la fase I.



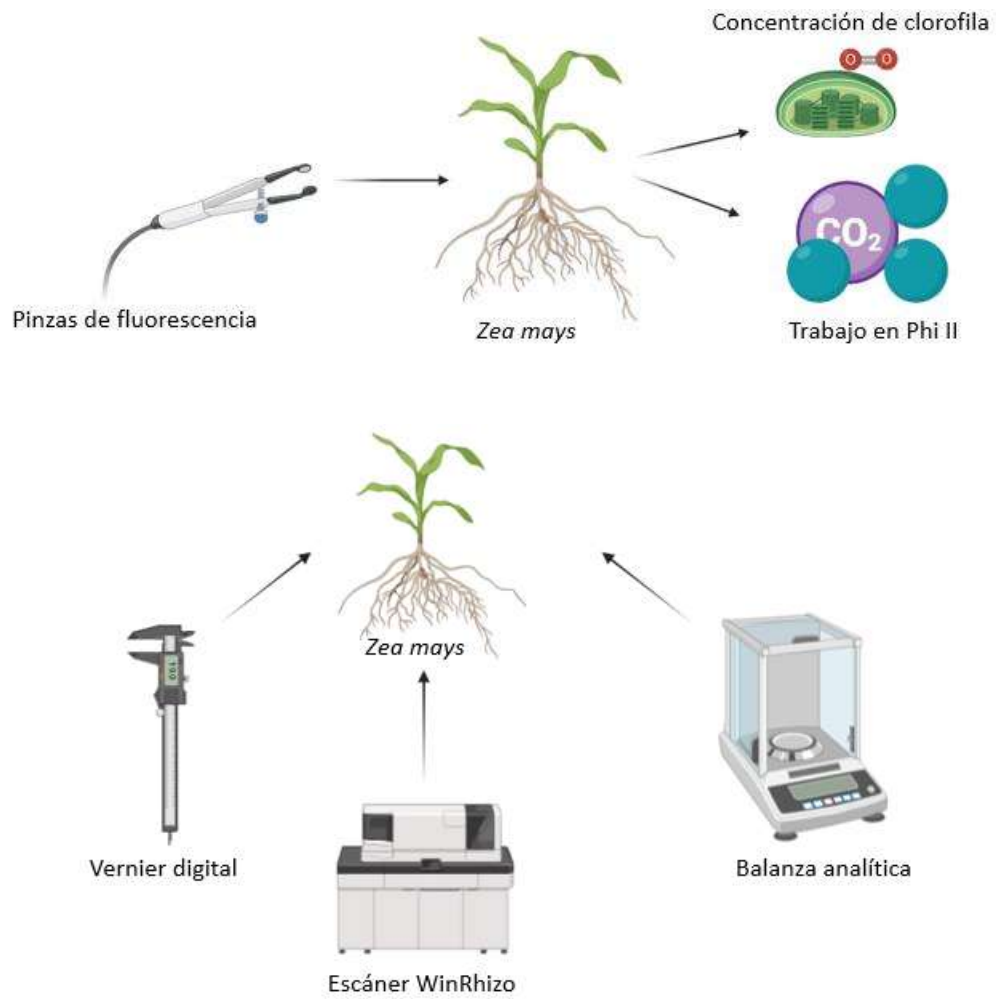


Figura 8. Bioensayos de maíz con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, análisis de parámetros biométricos.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se planteó un diseño experimental completamente aleatorio con 9 tratamientos (suplementados con NPs de ZnO suplementados con una solución mineral sin Zn, un control negativo [irrigado con agua] y un control positivo [plántulas irrigadas con una solución mineral con la dosis recomendada de zinc convencional] para cada una de las fases, es decir, 18 tratamientos y 4 controles). Se utilizaron 6 macetas para cada tratamiento, cada una con 5 plántulas, n=30, como se muestra en el cuadro siguiente:

Tabla 1. Tratamientos

Tratamientos	NPsZnO (µg/mL)	Solución mineral*
Control negativo (C-)	0	Zn-
Control positivo (C+)	0	Zn+
Tratamiento 1	1	Zn-
Tratamiento 2	2	Zn-
Tratamiento 3	4	Zn-
Tratamiento 4	8	Zn-
Tratamiento 5	16	Zn-
Tratamiento 6	32	Zn-
Tratamiento 7	64	Zn-
Tratamiento 8	128	Zn-
Tratamiento 9	256	Zn-

* *Solución mineral completa con Zn convencional (ZnSO₄ 0.96g/mL), sin Zn convencional.*

6.1 Variables respuesta

Para cumplir los objetivos de este trabajo de investigación se planteó evaluar las siguientes variables respuesta:

- Caracterización de nanopartículas de ZnO.
- Porcentaje y velocidad de germinación.
- En plántulas de maíz de 21 días de crecimiento se midieron los siguientes parámetros: Arquitectura radical, longitud de la planta, biomasa vegetal, fotosíntesis.
- Perfil mineral en semilla y en plántulas de 21 días de desarrollo vegetal.

6.2 Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), y se determinó si existían diferencias significativas al comparar las medias con las pruebas de LSD con $P < 0.05$, con software Statistic 8.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de las nanopartículas de ZnO

7.1.1 Análisis de nanopartículas de ZnO por espectroscopía de difracción de rayos X

Para realizar la caracterización de las nanopartículas de óxido de zinc, las muestras se analizaron mediante espectroscopía de difracción de rayos X. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9, donde se identificaron los picos característicos de las nanopartículas de óxido de zinc, de acuerdo con lo reportado por Aquino (2016), donde se identificaron los picos característicos siguientes: pico A en 0.36384° , B 0.4081° y C a 0.43886° , lo que nos indicia que se obtuvo un material cristalino a base de zinc.

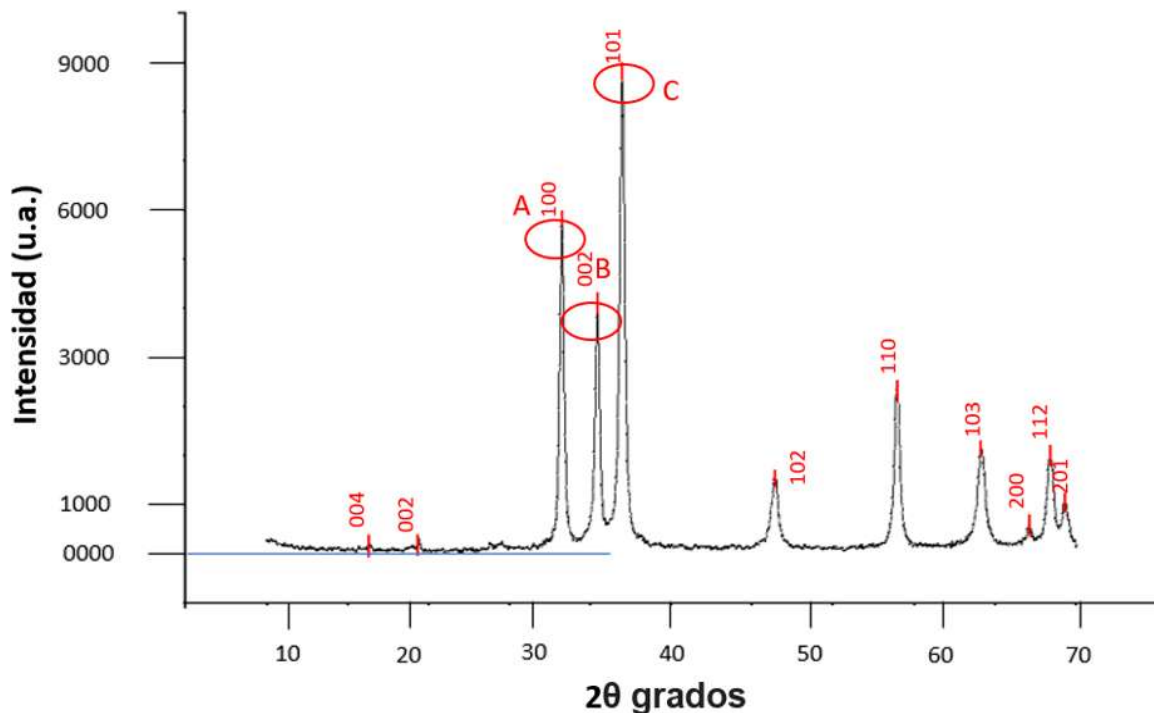


Figura 9. Espectro de difracción de rayos X de las nanopartículas de ZnO.

A partir del espectro de DRX se evaluó el ensanchamiento de picos para determinar El tamaño de los cristalitos y tensión de la red debido a la dislocación mediante trigonometría y la reflexión a partir de los ángulos que se forman de acuerdo con su morfología y la relación del valor FWHM (Full width at Half Maximum) de los picos característicos, obteniendo para el pico A un valor de 30.49, B= 9.60 y para el pico

C un valor de 22.62 u.a, obteniendo un promedio del tamaño de cristalito de 20.903 u.a.

7.1.2 Análisis de NPsZnO por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las nanopartículas de ZnO fue analizada mediante SEM, las micrografías obtenidas se muestran en la figura 10, donde las NPsZnO observa una morfología semi ovalada, con una porosidad variable, esta porosidad en las NPs puede ser variable dependiente de los precursores y método de síntesis y causar efectos en la bioquímica y morfología vegetal, debido a la variabilidad en la dispersión de las cargas de las nanopartículas, generando cambios energéticos.

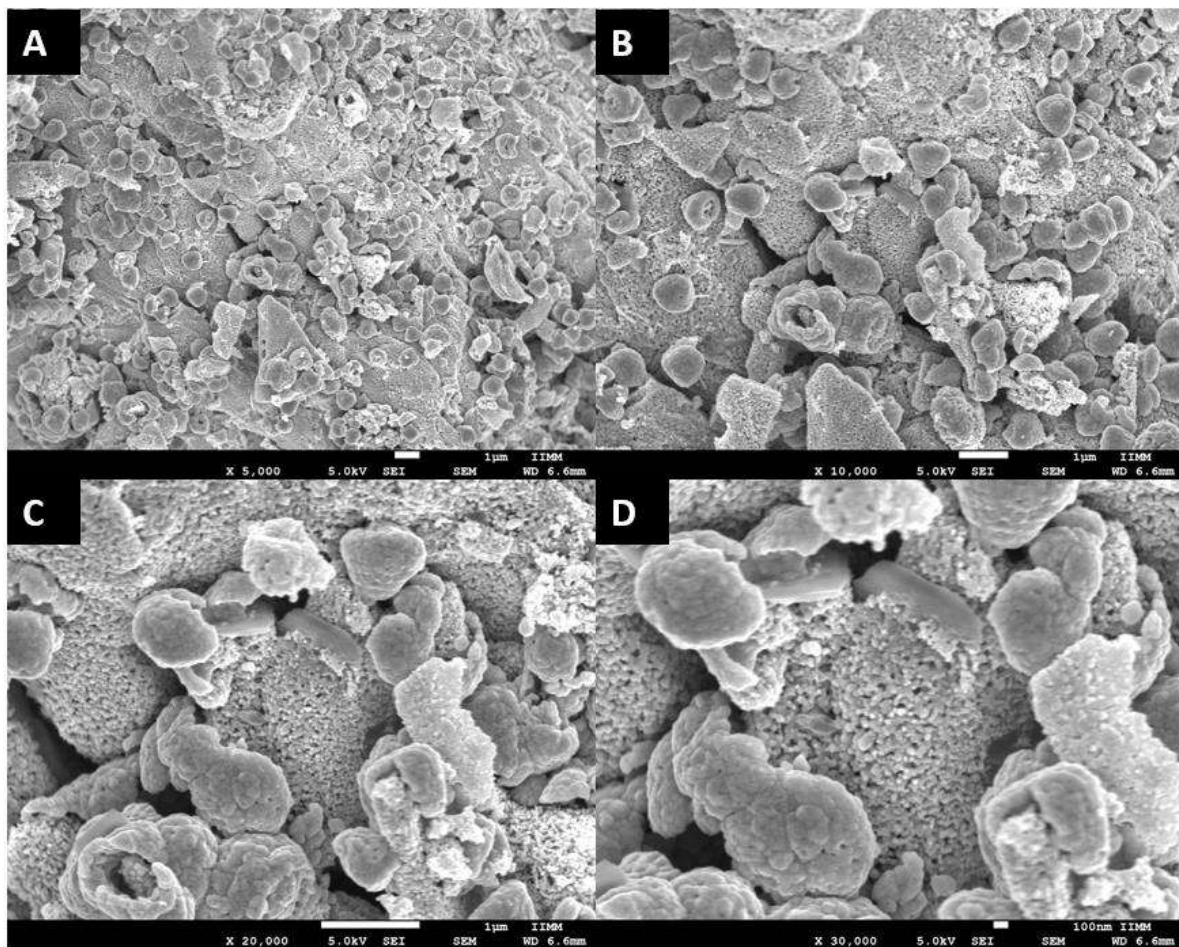


Figura 10. Micrografías de nanopartículas de ZnO obtenidas por microscopía electrónica de barrido, nanopartículas de óxido de zinc por método sol-gel. A, B, C y D muestran las NPsZnO obtenidas en aumento de 5k, 10k, 20k y 30k respectivamente.

Se determinó el tamaño de NPs en micrografía SEM de las nanopartículas de ZnO con un aumento de 60K (Figura 11). Los resultados mostraron que las NPs de ZnO obtenidas fueron de ~ 72.044 nm, característico de los nanomateriales, que se encuentran en rangos de 10 -100 nm.

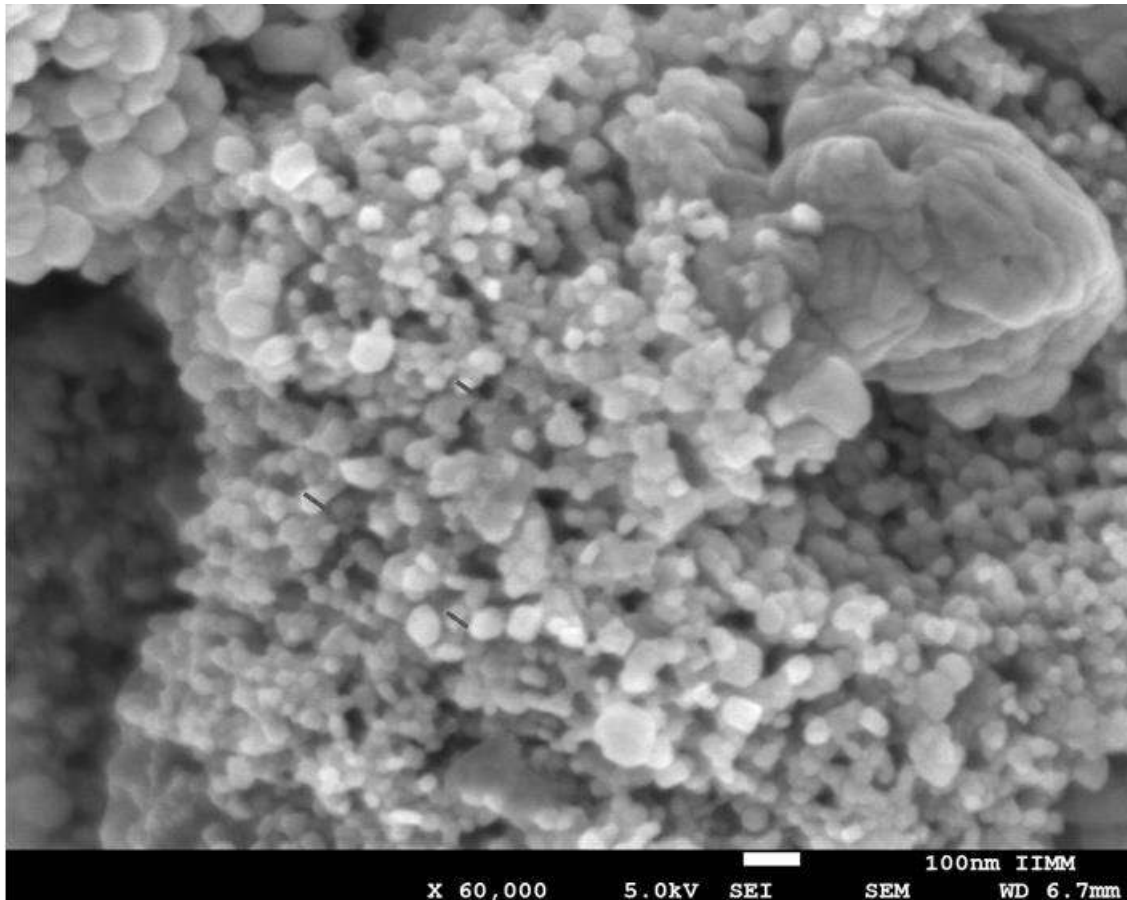


Figura 11. Micrografía electrónica de barrido de las nanopartículas de ZnO obtenidas por método sol-gel en aumento de 60K. Las líneas rojas muestran el diámetro de las NPs.

7.1.3 Análisis de nanopartículas de ZnO por espectroscopia Raman

En la figura 12 se muestra el espectro Raman de las NPs ZnO sintetizadas por sol-gel. Se identificaron tres frecuencias de onda características en la banda base, el A en ~ 436 cm^{-1} el B en ~ 580 cm^{-1} y el D en ~ 1156 cm^{-1} , todos estos característicos demostrado en múltiples estudios, sin embargo, la frecuencia A, siendo una las más documentadas corresponde a uno de los puntos de Fonón Transversal Óptico (FTO), este es un tipo de cuasipartícula en física del estado sólido que se asocia con las vibraciones colectivas de los átomos en una red cristalina. Los fonones TO son uno de los dos tipos principales de fonones ópticos, siendo el otro tipo los

fonones LO (Longitudinales Ópticos). Y este se confirma presente con la presencia de la frecuencia B (Khan, 2010; Sato-Berrú et al., 2007).

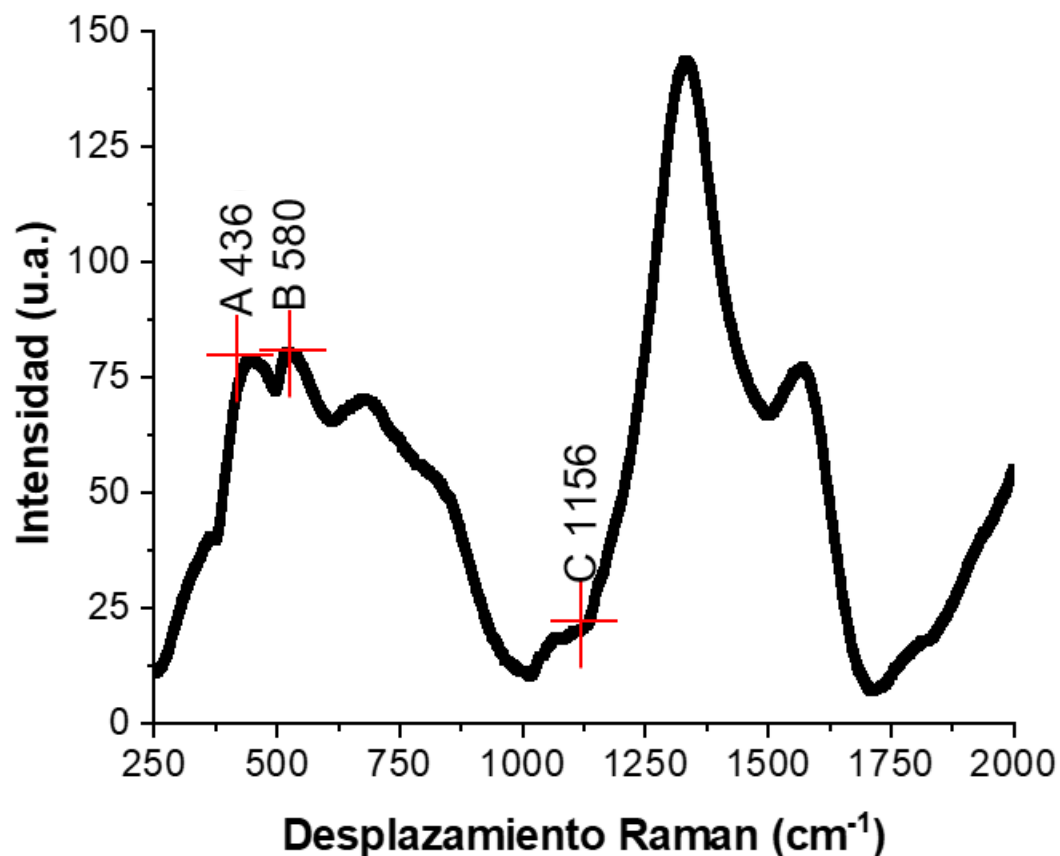


Figura 12. Espectro Raman de las nanopartículas de ZnO obtenidas por método Sol-Gel. Fragmento de desplazamiento Raman 250-2000 cm⁻¹.

7.1.4 Análisis de nanopartículas de ZnO por espectroscopía infrarroja por transformación de Fourier (FTIR)

Para identificar los grupos funcionales característicos de las NPsZnO, las muestras fueron analizadas por FTIR, donde se identificó un pico a 869 cm⁻¹ y otro en 1456, característicos del ZnO, asimismo se identificaron grupos funcionales típicos de los precursores que se utilizaron para la síntesis de las NPs, a 1103 cm⁻¹ se identificó al C-N, en 1381 cm⁻¹ un pico característico del NO₂ (Aquino et al., 2018), los cuales representan grupos carbono-carbono, carbono-hidrógenos y el más importante

Zinc-oxígeno con lo cual confirmamos que el método de síntesis fue exitoso al obtener las nanopartículas esperadas (Figura 13).

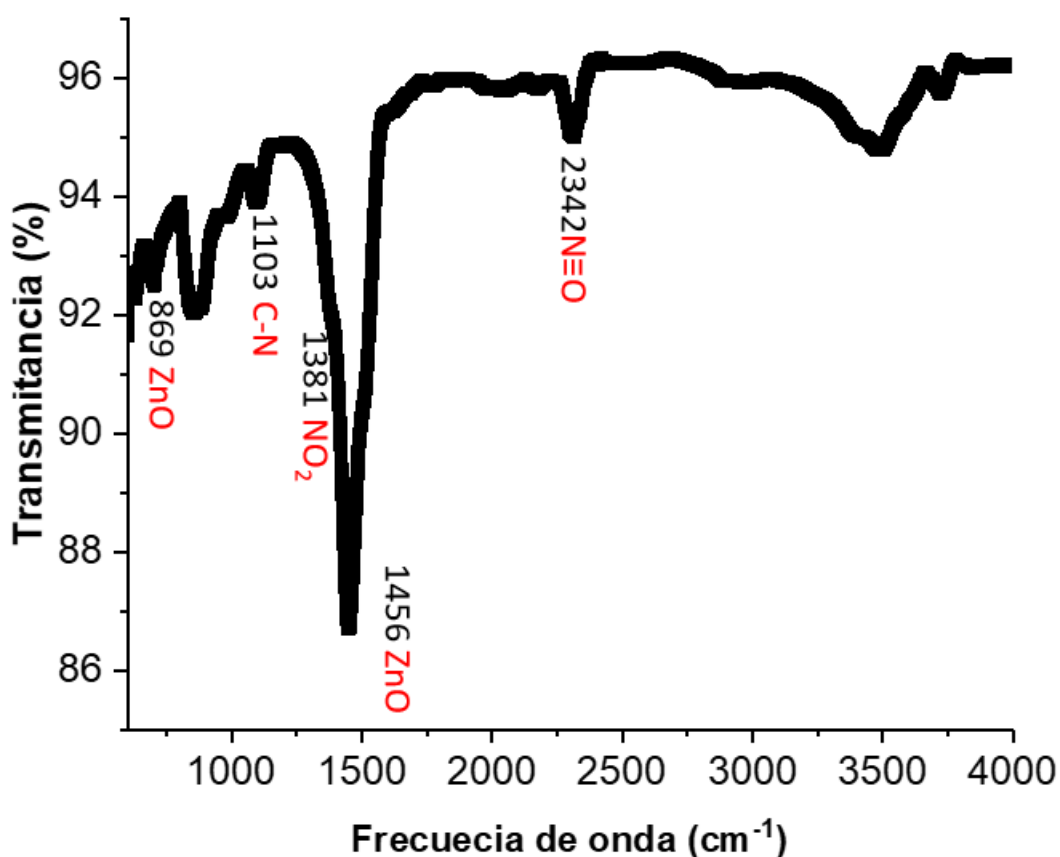


Figura 13. Espectroscopia FTIR de las nanopartículas de ZnO obtenidas por método Sol-Gel. Frecuencias características con grupos funcionales ZnO C-H y NO.

El análisis complementario de los análisis DRX, SEM, permitió identificar las características morfológicas de las NPs de ZnO, identificando que estas NPs presentan tamaño de los cristalitos (20.093 nm) y un tamaño de las NPs~72.044 nm. Asimismo, mediante FTIR y espectroscopía RAMAN, se obtuvo la identificación de estas NPs al detectarse mediante FTIR los grupos característicos ZnO, C-N y NO₂ de las NPs de ZnO y con Raman identificamos un punto en 436 sobre la banda de desplazamiento el cual se documenta como FTO, asegurando que se encuentra sobre una red cristalina perteneciente al ZnO.

7.2 Bioensayos de *Zea mays* con nanopartículas de ZnO

7.2.1 Análisis elemental en semillas de maíz previamente a su siembra

Para evaluar si el cebado de la semilla con NPs influye sobre la captación u absorción de este micronutriente previamente a su germinación, las semillas de *Zea mays* cebadas con nanopartículas, secadas y posteriormente pulverizadas se analizaron por FDX. Para evaluar el perfil mineral los resultados mostraron que la cantidad de zinc en semillas fue creciente al ir incrementando la concentración de NPs de zinc suplementadas, en concentraciones de 16-32 $\mu\text{g/mL}$ de NPs, la absorción de este metal fue muy similar, sin embargo, en concentraciones superiores fue aumentando la cantidad de zinc presente en las semillas de maíz, niveles muy superiores a lo observado en las semillas donde se suplementó el zinc en forma no nanoestructurada (control +) donde se obtuvo un contenido de Zn de 50 ppm, como en el control negativo donde las semillas únicamente estuvieron en contacto con agua, donde el zinc detectado fue de 30 ppm (Figura 14).

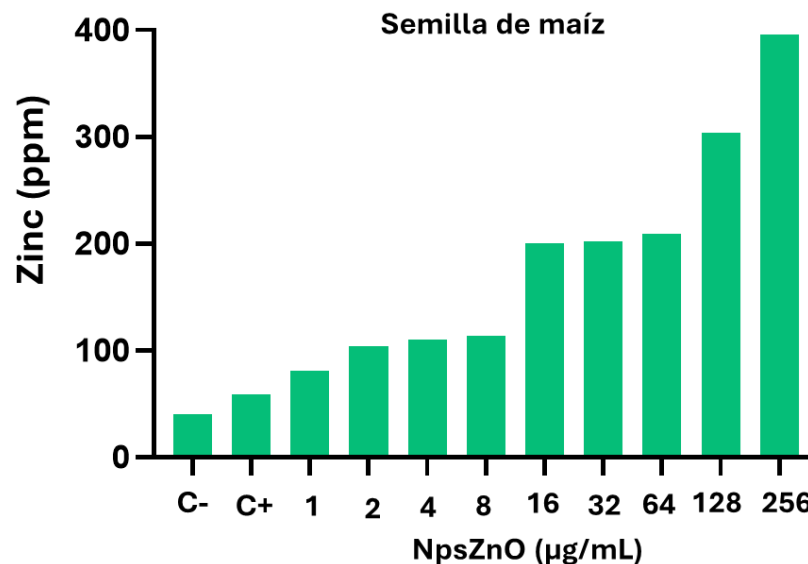


Figura 14. Zinc en semillas de maíz después de 24h en contacto con Zn convencional o nanoestructurado. Valores obtenidos mediante fluorescencia de rayos X. Con n=15

En la figura 15 se muestra el análisis cuantitativo de 3 macronutrientes de las semillas de maíz, que permitió conocer las cantidades de cada mineral al inicio de la siembra. Los resultados cuantitativos del K, S y P fueron analizados en las semillas de maíz después de 24h de impregnado con distintas concentraciones de

NpsZnO. Los resultados mostraron que en los tratamientos con 4-32 $\mu\text{g/mL}$ de NPs tuvieron un incremento evidente de la concentración de K en las semillas, mientras que en los demás tratamientos la cantidad de este macronutriente se mantuvo muy similar al de las semillas control (positivo y negativo) (figura 15A). Asimismo, la cantidad de S fue ligeramente superior en los tratamientos con 4-32 $\mu\text{g/mL}$ de NPs, y los demás tratamientos muy similar al control (figura 15B). Mientras que la cantidad de P mostró resultados similares en todos los tratamientos salvo en la concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$, la cual fue ligeramente mayor al resto.

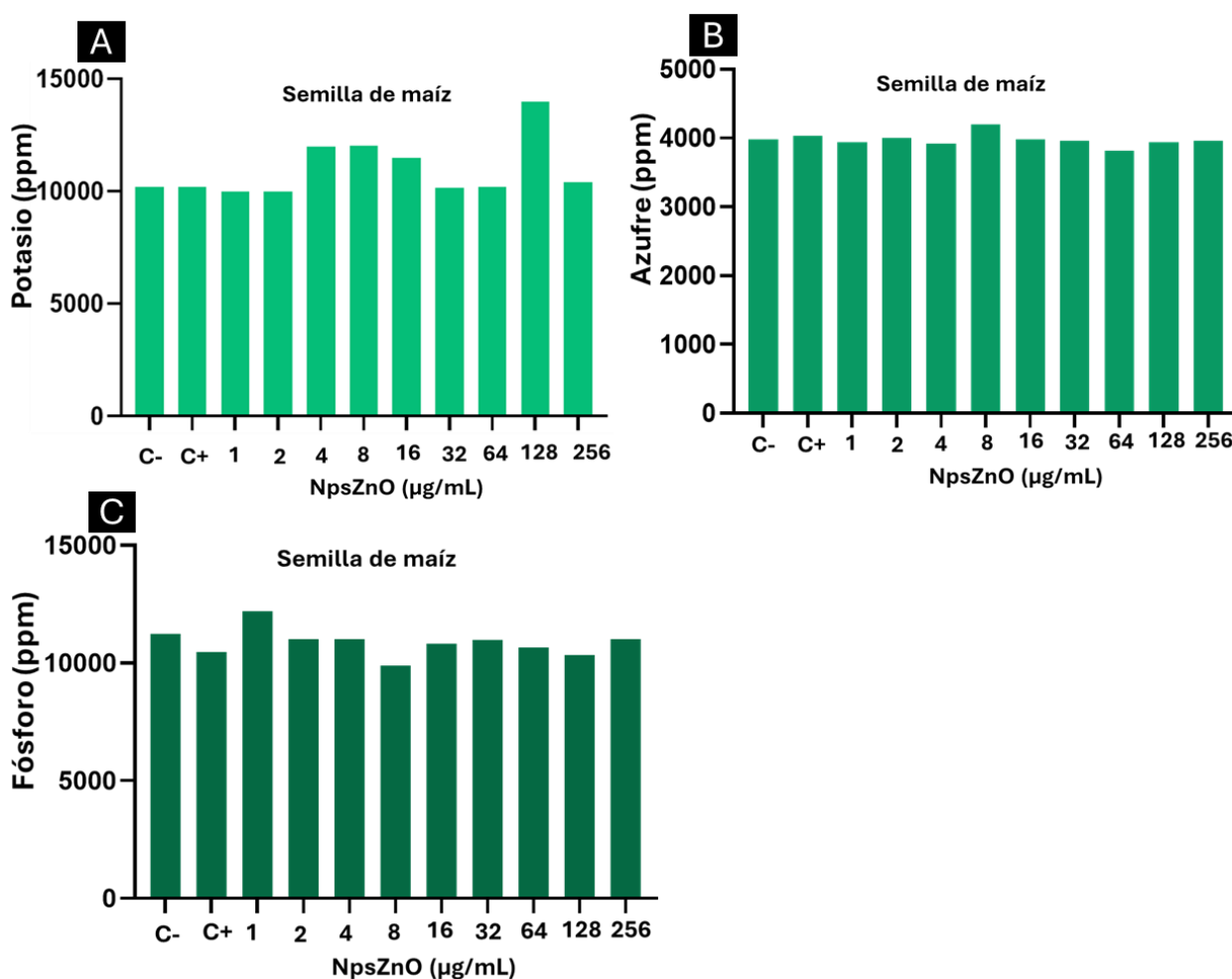


Figura 15. Macronutrientes detectados en semilla de maíz después de 24h en contacto con Zn convencional o nanoestructurado. A) Potasio, B) Azufre y C) Fósforo. Valores obtenidos mediante fluorescencia de rayos X, con $n=15$.

Fase I: Bioensayos *in vitro* de *Zea mays* con nanopartículas de ZnO

7.3 Germinación de semillas de maíz impregnadas con zinc convencional o con nanopartículas de ZnO en bioensayos *in vitro*

Para evaluar los efectos de las NPs de ZnO y el zinc convencional sobre la germinación de la semilla de maíz en condiciones *in vitro*, se seleccionaron las concentraciones de 1 a 256 $\mu\text{g/mL}$ de estas NPs. Los resultados obtenidos mostraron que, al suplementar el zinc nanoestructurado, impregnando las semillas 24h previamente a la siembra con estas NPs, en los tratamientos en concentraciones de 2-64 $\mu\text{g/mL}$ se incrementó tanto la velocidad como el porcentaje de germinación de la semilla, donde se observa que desde el día 2, todos los tratamientos con NPs en este rango de concentraciones fueron superiores que en las semillas control en los primeros días después de la siembra. Los resultados mostraron que en los tratamientos con 32 y 16 $\mu\text{g/mL}$ se alcanzó un 100 % de germinación en el día 4, mientras que en las semillas de los controles negativo y positivo se obtuvo un 75% de germinación a los 5 días. En contraste, al suplementar las NPs en una concentración más elevada, se detectó una inhibición de la germinación dependiente de la concentración; en las semillas impregnadas con 128 $\mu\text{g/mL}$ se detectó una un 40% de germinación y con 256 $\mu\text{g/mL}$ de NPs de ZnO el máximo de germinación obtenido fue de 37% a los 5 días después de la siembra (Figura 16).

En las figuras 17-19 se muestran imágenes representativas de la germinación de las semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO por 24h. Imágenes obtenidas 1 y 5 días después de la siembra.

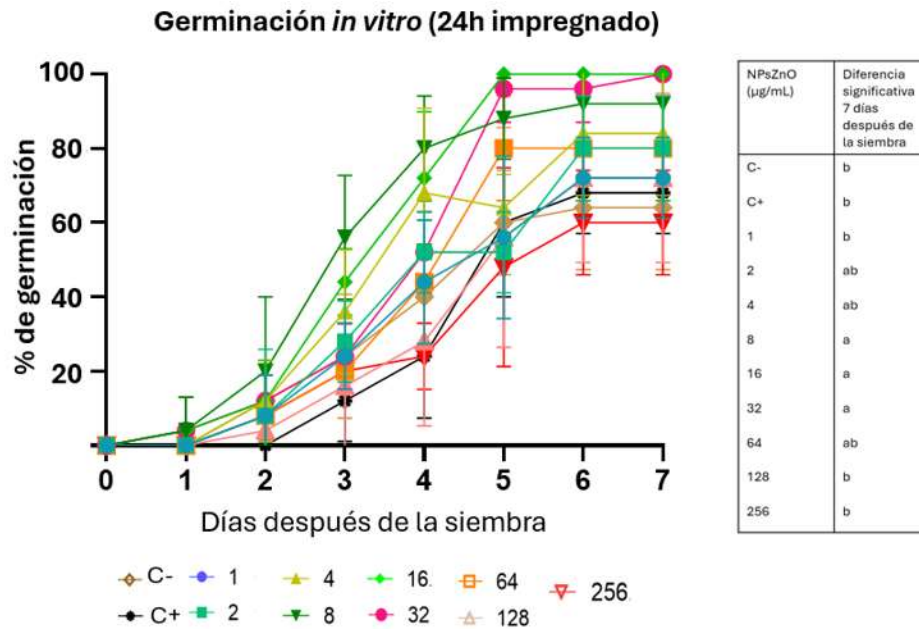


Figura 16. Germinación de semillas de maíz impregnadas durante 24 h con nanopartículas de ZnO ensayo *in vitro*. Diversas concentraciones de NPsZnO en Los datos fueron analizados al séptimo día con ANOVA-LSD con $p = \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.



Figura 17. Semillas de maíz día de la siembra.

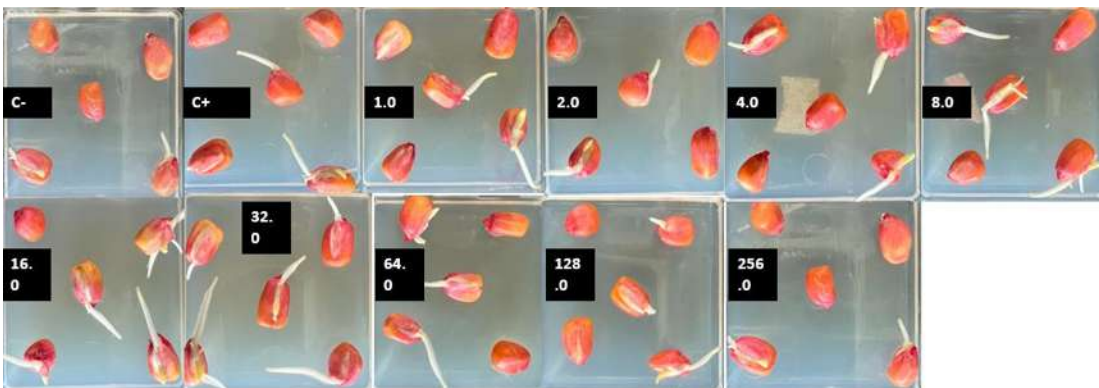


Figura 18. Semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional dos días después de su siembra.

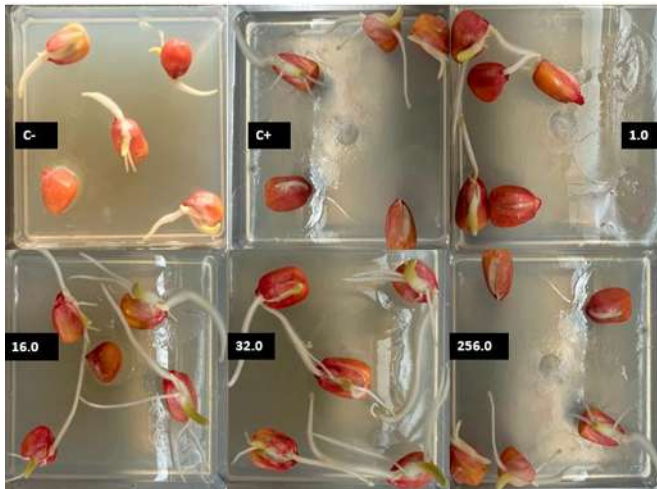


Figura 19. Semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional 5 días después de su siembra.

7.4 Germinación de semillas de maíz suplementadas con zinc convencional o nanopartículas de ZnO 24 h suplementadas en el momento de la siembra en condiciones *in vitro*

La germinación de las semillas también se evaluó al vernalizar las semillas únicamente en agua por 24h, y agregar estas NPs al momento de la siembra.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20 donde se observó que la velocidad y el porcentaje de germinación en las semillas del control positivo (semillas suplementadas con zinc convencional) y los tratamientos con nanopartículas en concentraciones de 1-64 $\mu\text{g/mL}$ no mostraron diferencias significativas entre sí, pero alcanzaron porcentajes superiores que las semillas del control negativo. En contraste, se observó que las concentraciones más altas de NPs de ZnO (128 y 256 $\mu\text{g/mL}$) tuvieron los porcentajes más altos de germinación al día 5 después de la siembra.

Germinación *in vitro* (agregado en siembra)

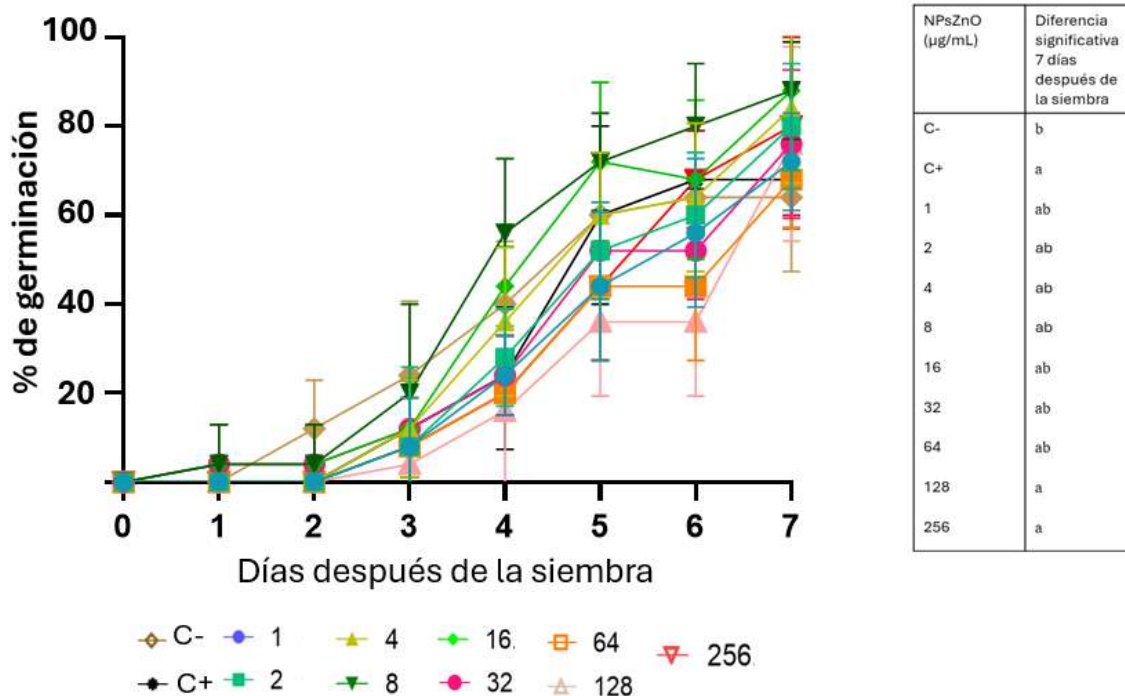


Figura 20. Germinación de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de ZnO al momento de la siembra en bioensayo *in vitro*. Los datos fueron analizados al séptimo día con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

A continuación, se muestran imágenes representativas tomadas en el segundo y quinto día después de la siembra, en las cuales se observa la progresión de la germinación y se representan en las figuras 21-22.

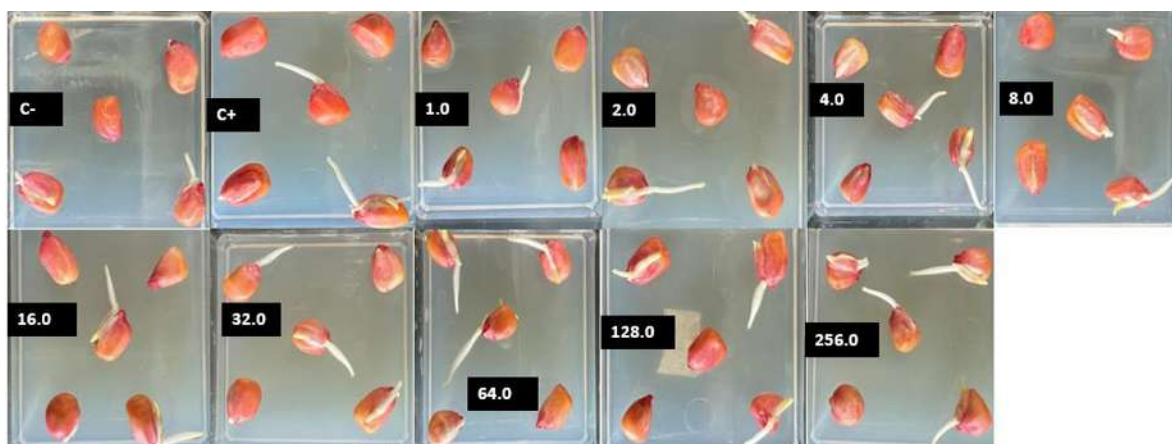


Figura 21. Semillas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional al momento de la siembra, dos días después de la siembra.



Figura 22. Semillas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO o zinc convencional 5 días después de la siembra.

Fase II: **Bioensayos de *Zea mays* con nanopartículas de ZnO cultivado en condiciones de fitotrón**

Para esta segunda fase experimental, se realizaron bioensayos en fitotrón para evaluar el desarrollo de maíz cultivados con las distintas concentraciones de ZnO o zinc convencional a nivel de germinación y en estadio de plántula y evaluar su efecto en parámetros fotosintéticos y perfil mineral.

7.5 Germinación de semillas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO en bioensayos en fitotrón

Los resultados obtenidos sobre la germinación de las semillas se muestran en la figura 23. Podemos observar que en las semillas impregnadas con 4-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs, se obtuvo una mayor velocidad y porcentaje de germinación comparado a los demás tratamientos y a ambos controles donde no se suplementaron las NPs, siendo los tratamientos con 16-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los que alcanzaron el mayor % de germinación. En contraste, con 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó una disminución de la germinación.

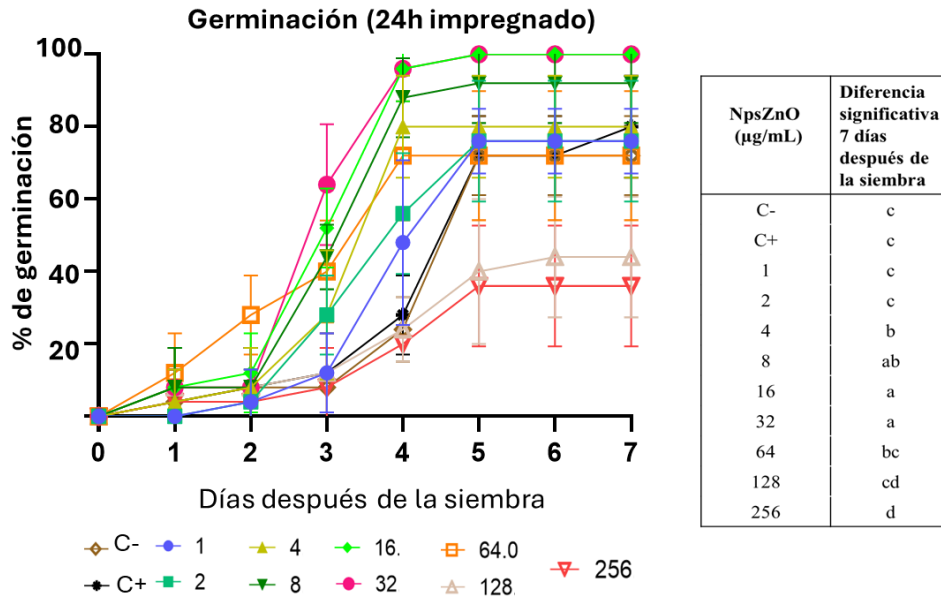


Figura 23. Germinación de semillas de maíz impregnadas durante 24 h en fitotrón. Diversas concentraciones de NPsZnO, los datos fueron analizados al séptimo día con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

La germinación de maíz también se evaluó en condiciones de fitotrón, en donde se agregaron las distintas concentraciones de NPs de Zn o el zinc convencional en el momento de la siembra de la semilla (Figura 24).

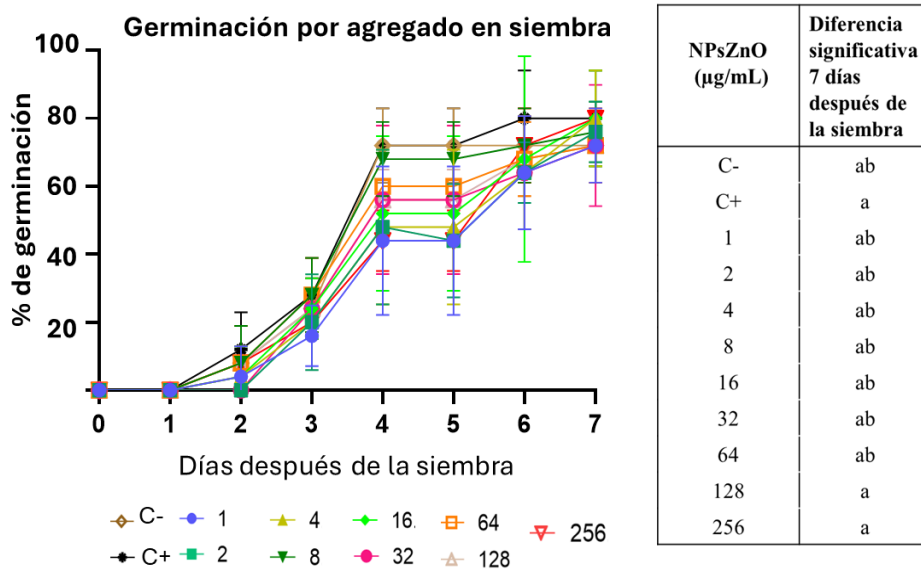


Figura 24. Germinación de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de ZnO al momento de la siembra en condiciones de fitotrón. Los datos fueron analizados al séptimo día con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

7.6 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre la altura de maíz en estadio de plántula

Al ser el zinc un micronutriente móvil, este nutriente participa en distintos procesos metabólicos que regulan el desarrollo vegetal. Por lo que se evaluó el efecto de las NPs de ZnO y se comparó con el efecto del zinc convencional sobre la altura de las plántulas de maíz, 21 días posteriores a la siembra. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 25. En la figura 25A se muestra la altura de las plantas que fueron impregnadas con las NPs 24 h previamente a su siembra, puede observarse que las plántulas impregnadas con nanopartículas en 1- 64 $\mu\text{g/mL}$ mostraron tener una mayor longitud que las plantas control negativo. Y al compararlas con las plántulas suplementadas con Zn convencional, se puede observar que al adicionar este micronutriente en forma nanoestructurada se favoreció el crecimiento de las plántulas en concentraciones de 8-32 $\mu\text{g/mL}$, alcanzándose una mayor longitud con $\mu\text{g/mL}$ de NPs. En contraste, los tratamientos de 128 y 264 $\mu\text{g/mL}$ no mostraron diferencias significativas comparado con las plántulas control.

En las figuras 26 y 27 Se muestran imágenes representativas del crecimiento del maíz 21 días después de la siembra.

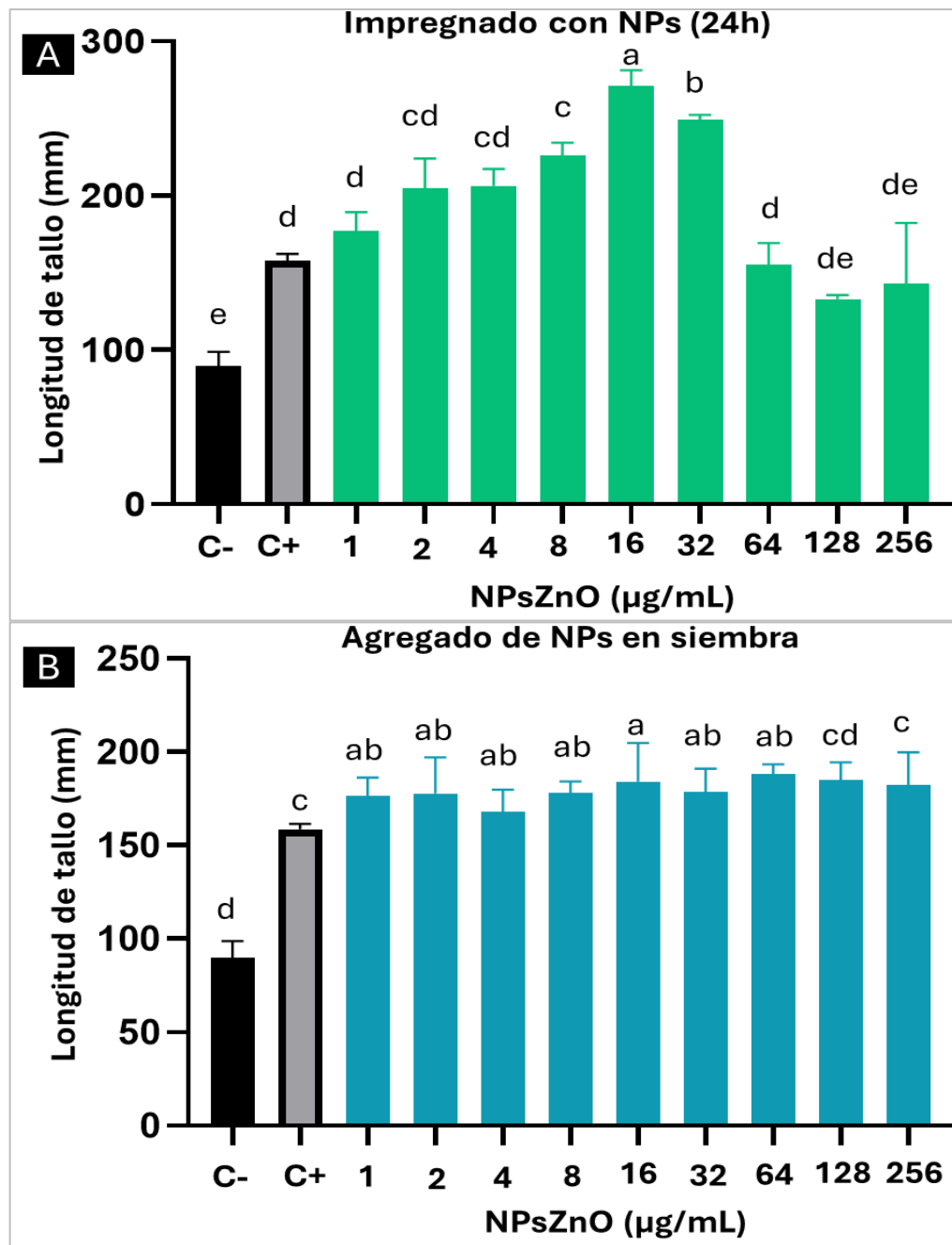


Figura 25. Longitud del tallo de plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra. A) Las semillas fueron impregnadas de NPsZnO durante 24h previamente a la siembra. B) se suplementaron las NPs en el momento de la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

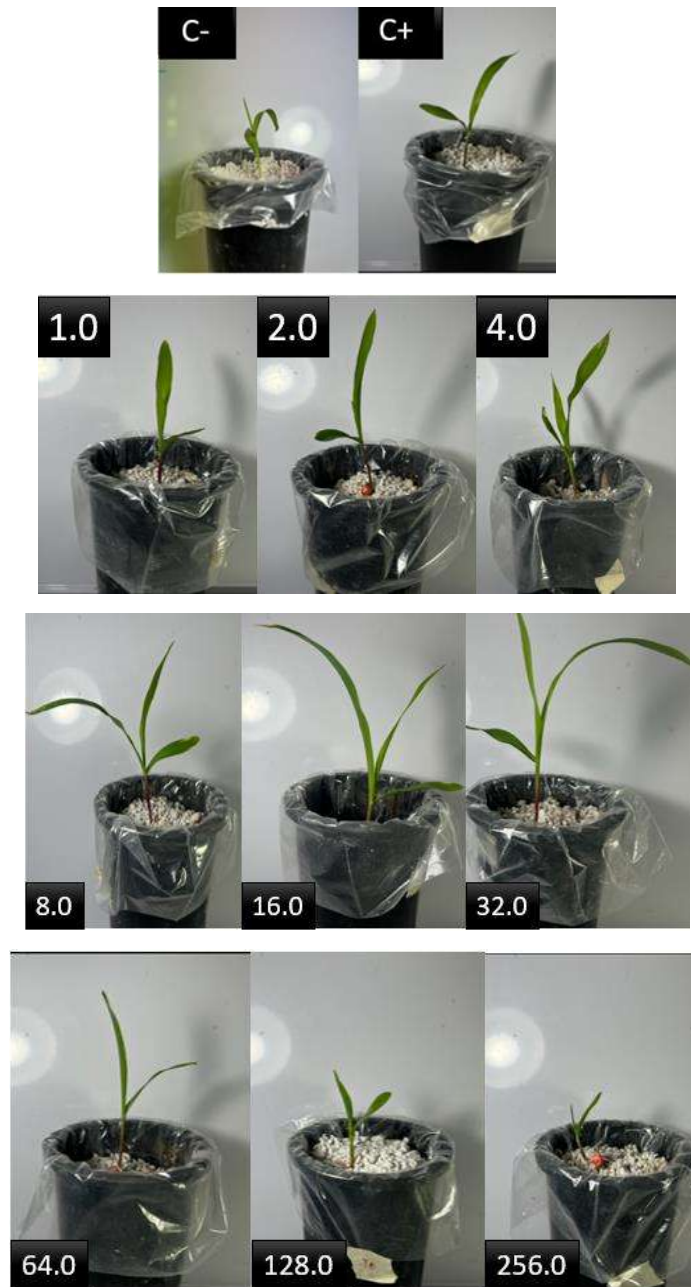


Figura 26. Plántulas de maíz que fueron impregnadas con NPsZnO previamente a su siembra, crecimiento a 21 días después de su siembra. *Se indican las concentraciones de NPs dentro de los cuadros en color negro, expresan $\mu\text{g/mL}$; (+) tratamiento con zinc convencional (ZnSO_4 0.86g/mL), (-) tratamiento sin zinc.



Figura 27. Plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO suplementadas al momento de la siembra, crecimiento 21 días después de su siembra. *Se indican las concentraciones de NPs dentro de los cuadros en color negro, expresan µg/mL; (+) tratamiento con zinc convencional (ZnSO₄ 0.86g/mL), (-) tratamiento sin zinc.

7.7 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre parámetros fotosintéticos en plántulas de maíz.

Otro de los parámetros evaluados en el presente estudio, fueron factores relacionados a la fotosíntesis: la tasa fotosintética a través fotosistema II y el contenido de clorofilas.

En la figura 28 se muestran los resultados de Phi2 obtenido en plántulas de maíz cultivadas con las NPs de ZnO, 21 días posteriores a su siembra. En la figura 28A se muestra Phi2 de las plántulas que fueron impregnadas con las NPs de ZnO durante 24 h. En la figura 28B se muestra el valor Phi2 obtenido en plántulas donde se agregaron las nanopartículas al momento de la siembra. En ambos casos, se pudo observar que al aplicar NPs de ZnO en concentraciones de 1-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Phi2 fue significativamente superior que en las plántulas control negativo. Mientras que al comparar las plántulas suplementadas con zinc convencional (control +) y las que crecieron con zinc nanoestructurado, se observó que Phi2 fue significativamente mayor en los tratamientos con a 16 y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs.

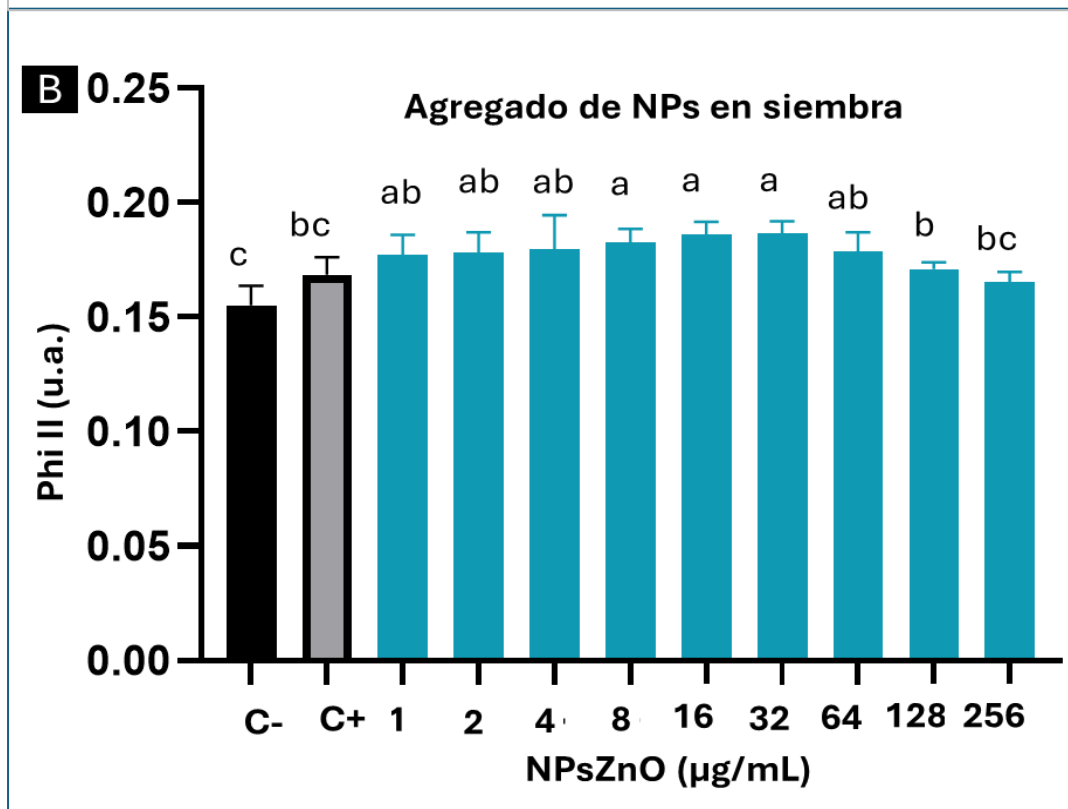
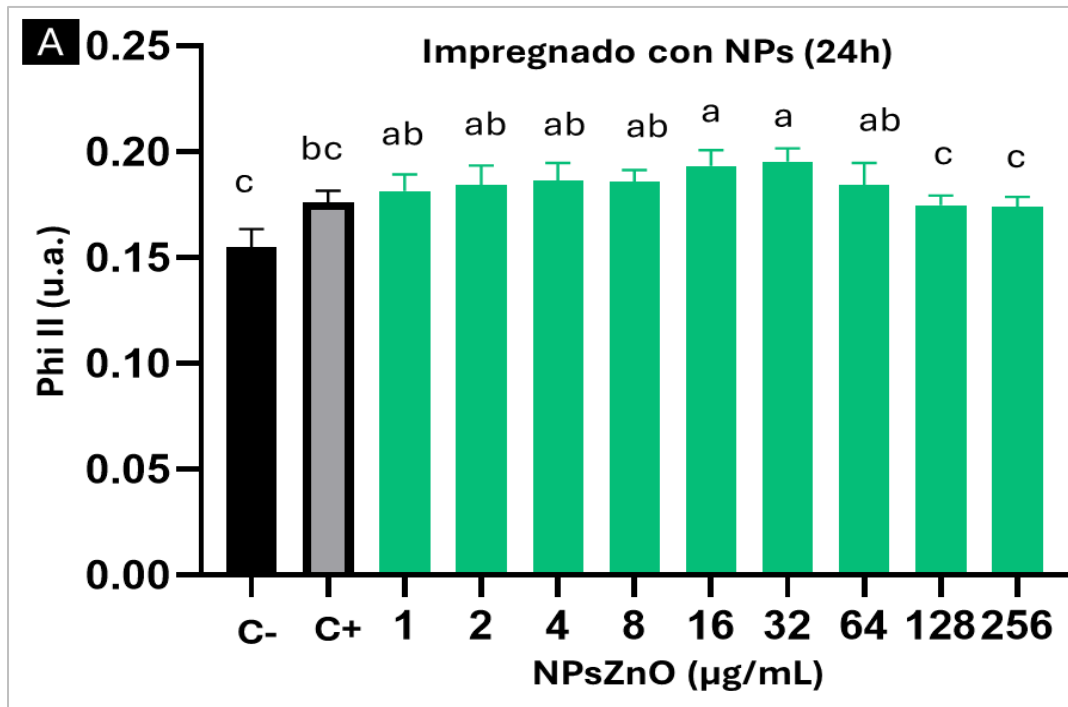


Figura 28. Phi2 en plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra. A) Las semillas fueron impregnadas de NPsZnO durante 24h previamente a la siembra. B) Se suplementaron las NPs en el momento de la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

El contenido de clorofila fue evaluado en unidades SPAD obteniendo las clorofilas “A”, “B” y total. En las figuras 29-31 se muestra el contenido de clorofila A, B y total de las plántulas cultivadas con semillas impregnadas antes de la siembra. Los resultados obtenidos mostraron que todos los tratamientos estimularon la formación de clorofila A comparado con las plántulas control negativo. Mientras que al compararlo con el control positivo (suplementado con zinc convencional, se pudo observar que en concentraciones 1, 64, 128 y 256 $\mu\text{g/ml}$ no se reportaron diferencias significativas, sin embargo, en concentraciones de 2-32 $\mu\text{g/mL}$ de NPs, estas estimularon la síntesis de clorofila A al registrarse diferencias significativas comparado a las plantas con zinc convencional (Figura 29).

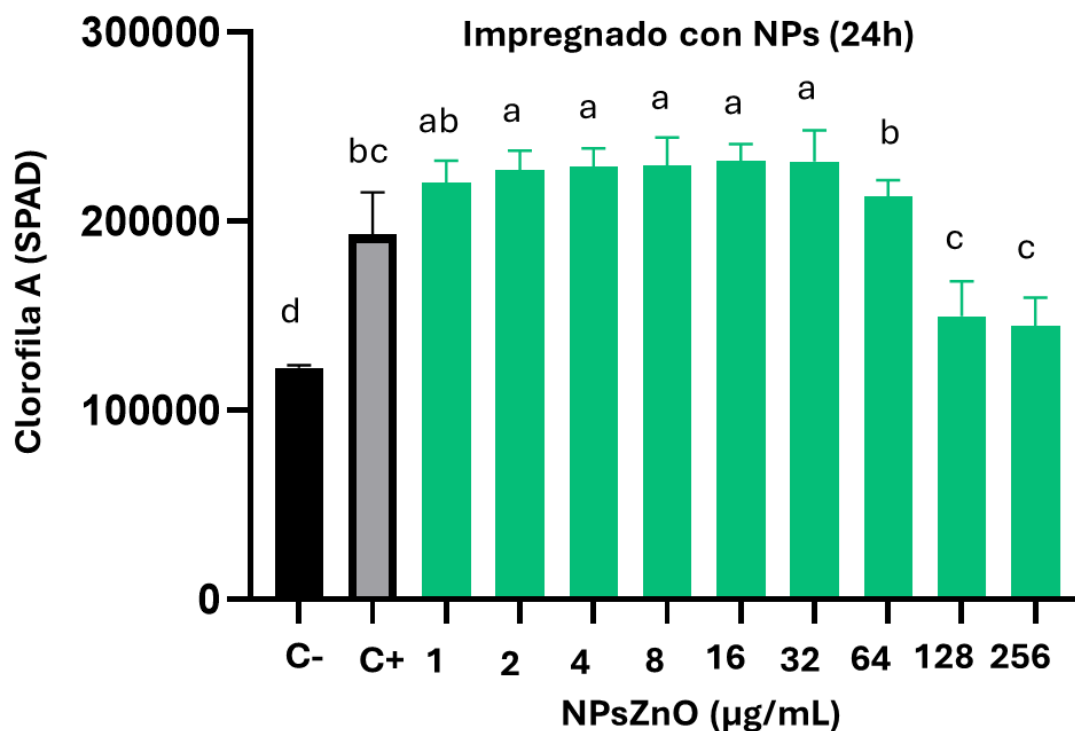


Figura 29. Clorofila “A” en plantas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO 21 después de la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

En la figura 30, se muestra el análisis cuantitativo de la clorofila B, donde se observa que todos los tratamientos evaluados estimularon la formación de clorofila B comparado con las plántulas control. Por otro lado, al comparar los resultados con las plántulas suplementadas con zinc convencional podemos observar que las

concentraciones más altas suplementas tuvieron un comportamiento similar, sin embargo, en concentraciones más bajas de NPs (1-64 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO) se estimuló significativamente la clorofila B.

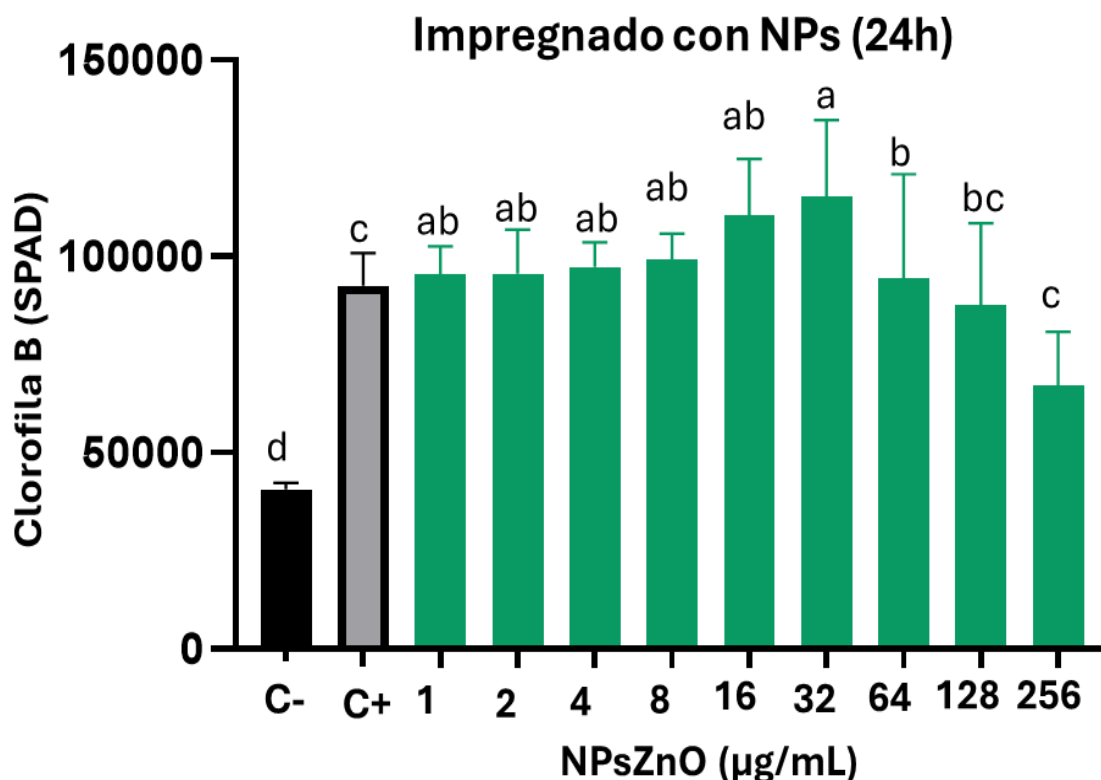


Figura 30. Clorofila “B” en plantas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO 21 después de la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$

En la figura 31, se muestra el análisis cuantitativo de la clorofila total, donde se observó que todos los tratamientos evaluados estimularon la formación de clorofila comparado con las plántulas control negativo. Por otro lado, al comparar los resultados con las plántulas suplementadas con zinc convencional se detectó que con 128 $\mu\text{g/mL}$ de NPs no se generaron diferencias significativas, al aumentar a 256 $\mu\text{g/mL}$ disminuyó significativamente el contenido de clorofila total. Sin embargo, en los tratamientos donde se suplementaron las NPs en concentraciones entre 1-64 $\mu\text{g/mL}$ la síntesis de clorofila total obtenida fue significativamente superior.

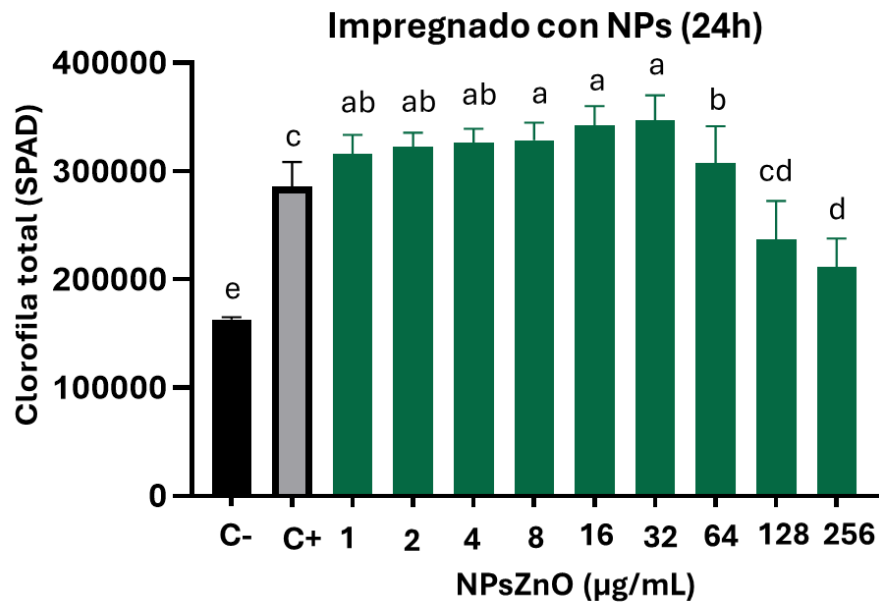


Figura 31. Clorofila total en plantas de maíz impregnadas con nanopartículas de ZnO 21 después de la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

El contenido de clorofila fue evaluado en unidades SPAD obteniendo las clorofilas “A”, “B” y total. En las figuras 32-34 se muestra el contenido de clorofila A, B y total de las plántulas cultivadas con semillas en las que se agregaron las NPs de ZnO al momento de la siembra. Los resultados obtenidos mostraron que la síntesis de clorofila A en todos los tratamientos fue significativamente superior al control negativo, pero no se detectaron diferencias comparado con las plantas suplementadas con zinc convencional (Figura 32).

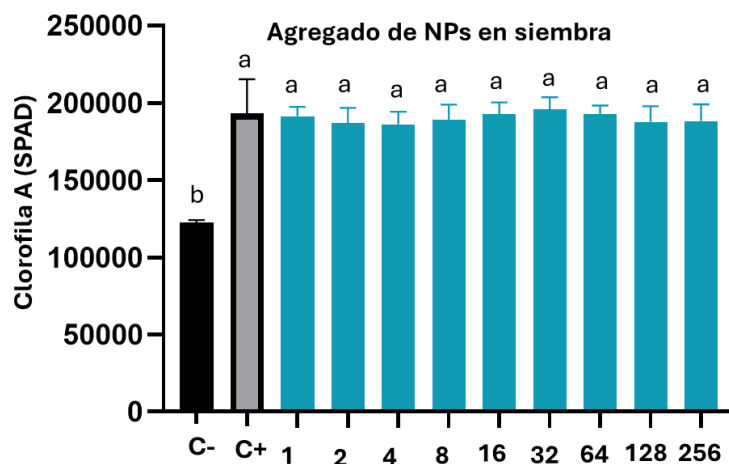


Figura 32. Clorofila “A” en plantas de maíz con nanopartículas de ZnO agregadas en siembra 21 después de ser sembradas. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n = 5$

Podemos observar como la clorofila B se mantiene sin diferencias en los tratamientos, a diferencia del método de impregnado en el cual en comparación existen diferencias en los valores, únicamente C- mantiene un valor muy por debajo del promedio general (Figura 33).

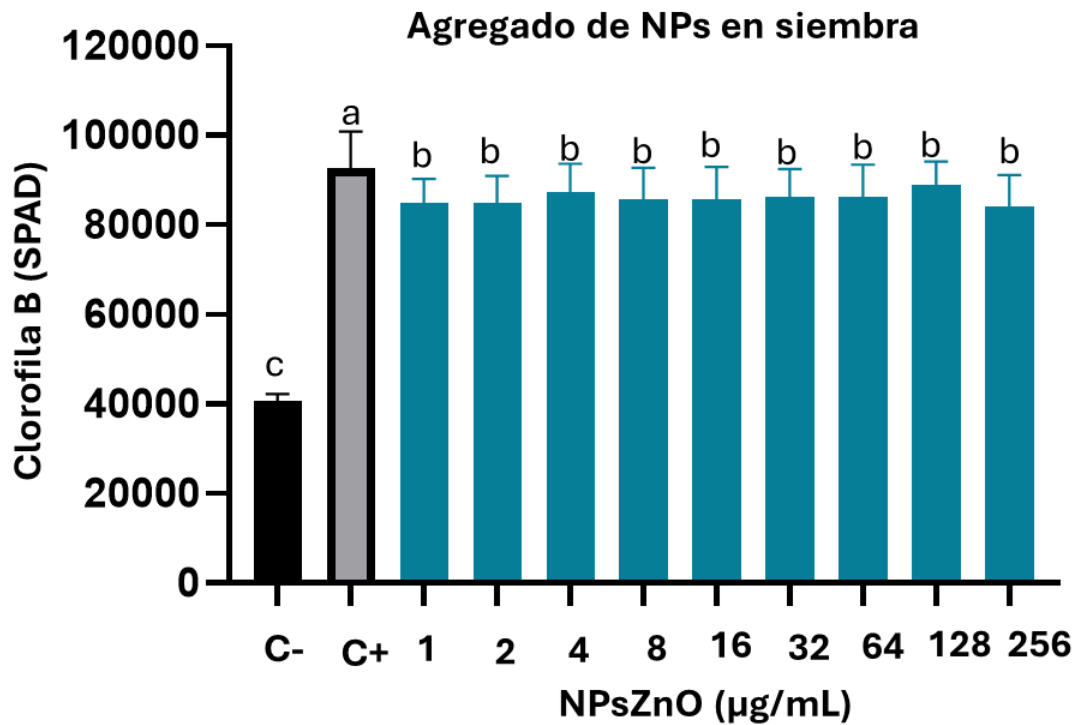


Figura 33. Clorofila “B” en plantas de maíz con nanopartículas de ZnO agregadas en siembra 21 después de ser sembradas. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la clorofila total mostraron la misma tendencia que para la clorofila total, donde se observó que al suplementar el zinc convencional se mejora la síntesis de este pigmento, al obtenerse niveles superiores que los de las plantas tratadas con nanopartículas (Figura 34).

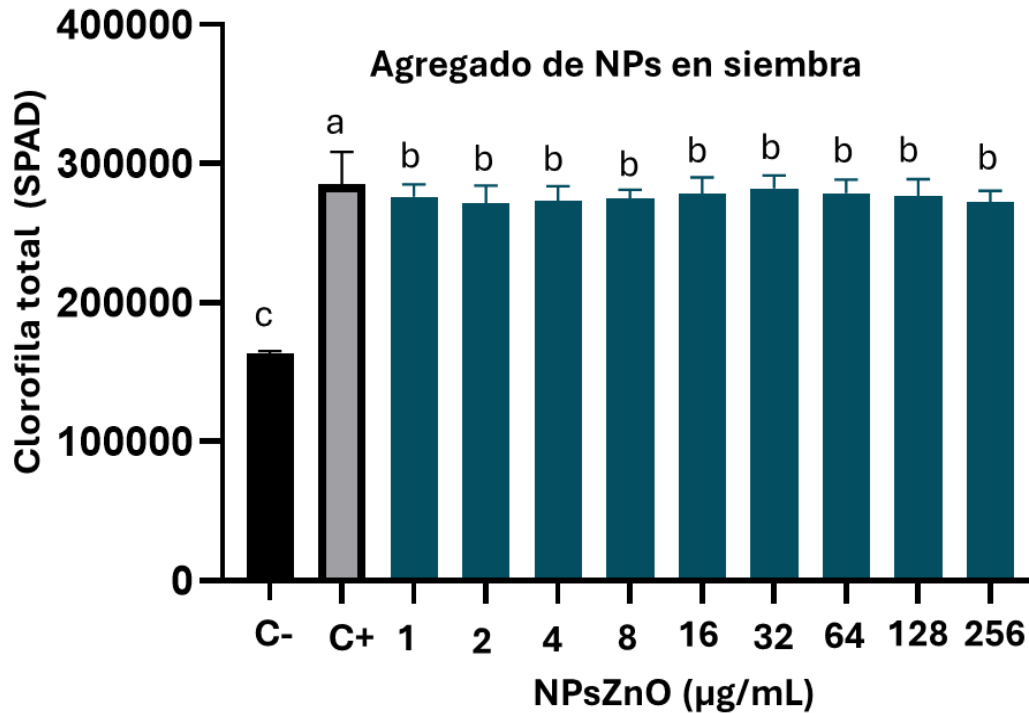


Figura 34. Clorofila total en plantas de maíz con nanopartículas de ZnO agregadas en siembra 21 después de ser sembradas. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

De acuerdo con el análisis comparativo entre el método de impregnado y al suplementarse las NPs al momento de la siembra, puede inferirse que al impregnar las semillas con las NPs de ZnO es un proceso que influye significativamente en los parámetros fotosintéticos.

7.8 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre la arquitectura radical en plántulas de maíz

Para evaluar los efectos de las nanopartículas de ZnO sobre el desarrollo radical, se evaluó la longitud de la raíz, así como el número de raíces laterales. En la figura 35A puede observarse que al impregnar las semillas con las NPs previamente a la siembra, se estimuló la longitud de la raíz del maíz en concentraciones de 1-64 µg/mL, al compáralo con las plántulas control que fueron suplementadas con zinc convencional. En contraste, si las plantas no fueron impregnadas con las NPs antes de la siembra y estas se agregaron al momento de la siembra, se puede observar

que no se detectan diferencias significativas comparado con las plántulas con zinc convencional figura 35B.

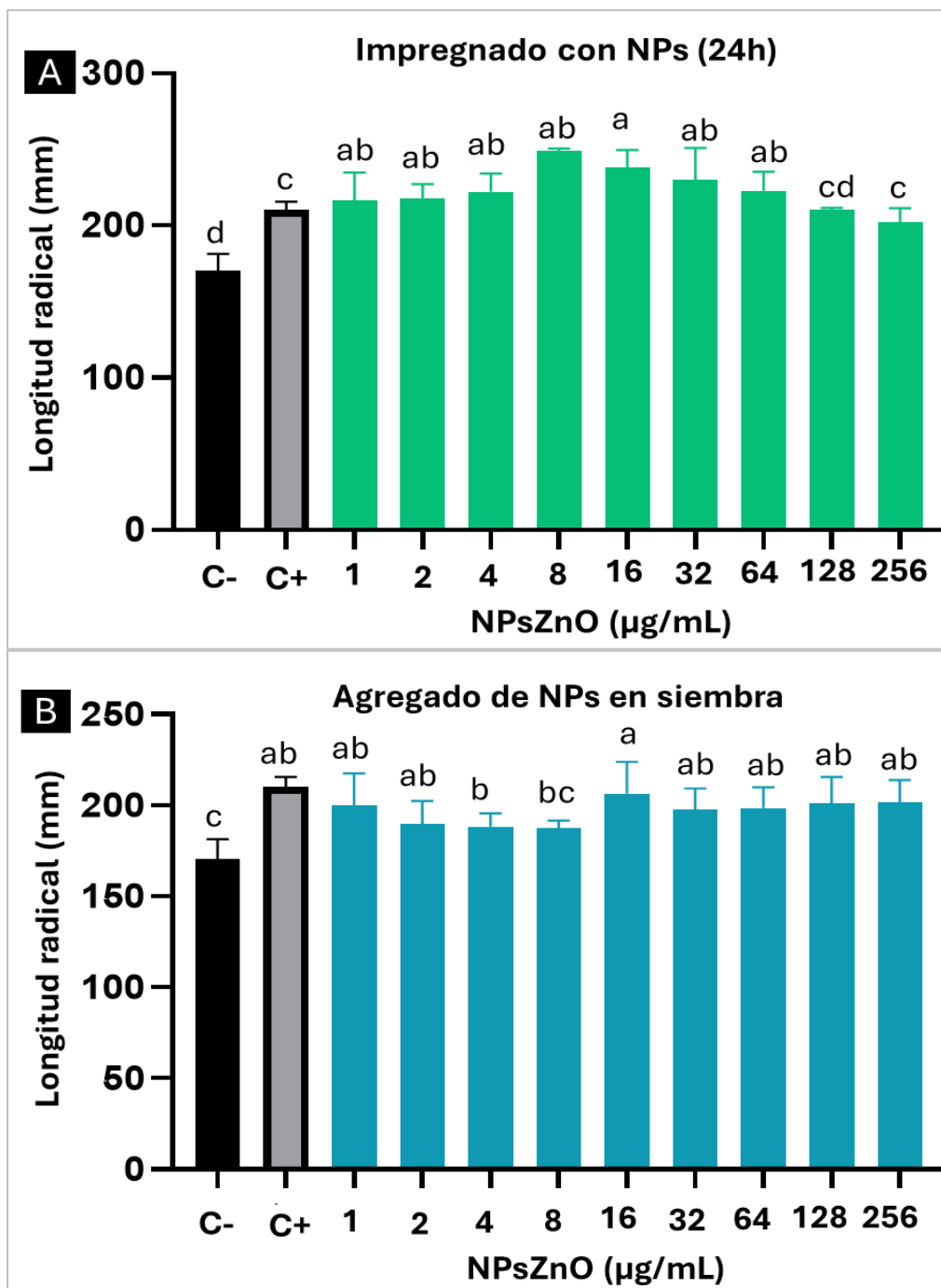


Figura 35. Longitud radial en plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra. A) Las semillas fueron impregnadas de NPsZnO durante 24h previamente a la siembra. B) se suplementaron las NPs en el momento de la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

El análisis sobre los efectos de las NPs de ZnO sobre el número de raíces laterales se muestra en la figura 36. Los resultados obtenidos sobre las plantas donde se impregnaron las nanopartículas antes de la siembra mostraron que todos los tratamientos presentaron un mayor número de raíces laterales comparado con las plántulas control. Mientras que las concentraciones de 16 y 64 $\mu\text{g/ml}$ estimularon la formación de raíces laterales comparado con las plantas control suplementadas con zinc convencional. Se observa que para el impregnado en la concentración de 16 y 64 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo el mayor número de raíces laterales, por su parte en el agregado en siembra 8 y 256 $\mu\text{g/ml}$ muestran el mejor resultado, sin embargo para el caso del impregnado es más fácil observar las diferencias con respecto a los controles mientras que el agregado aunque muestra diferencias no podríamos asegurar que sea por el uso de las nanopartículas ya que las diferencias aunque existen son pocas y no tienen un intervalo racional.

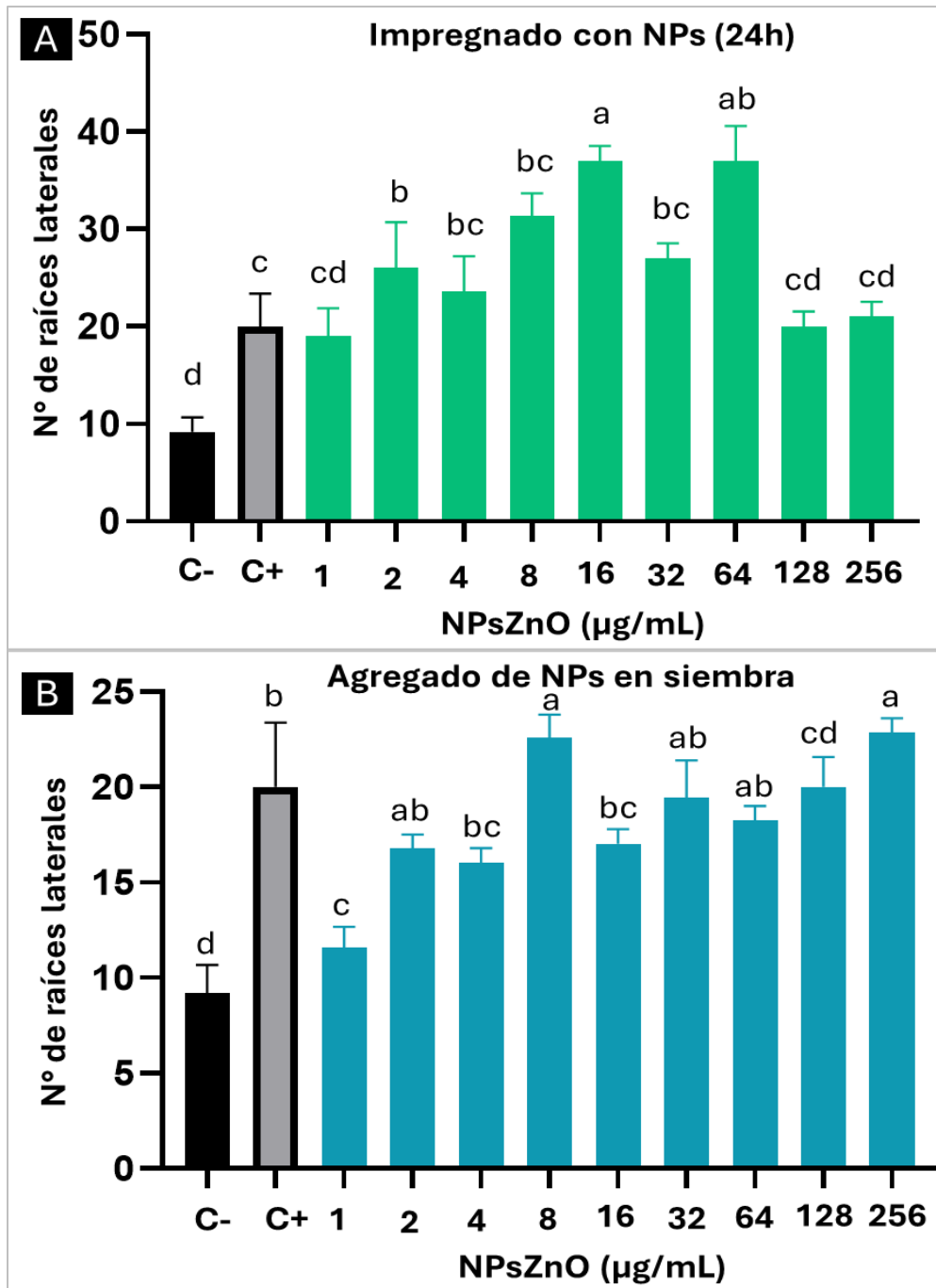


Figura 36. Número de raíces secundarias en plántulas de maíz cultivadas con nanopartículas de ZnO en condiciones de fitotrón, 21 días después de la siembra. A) Las semillas fueron impregnadas de NPsZnO durante 24h previamente a la siembra. B) se suplementaron las NPs en el momento de la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

A continuación, se muestran fotos de las plántulas de maíz tomadas en escáner con el software WinRHIZO, a los 21 días después de la siembra (Figura 37-38).

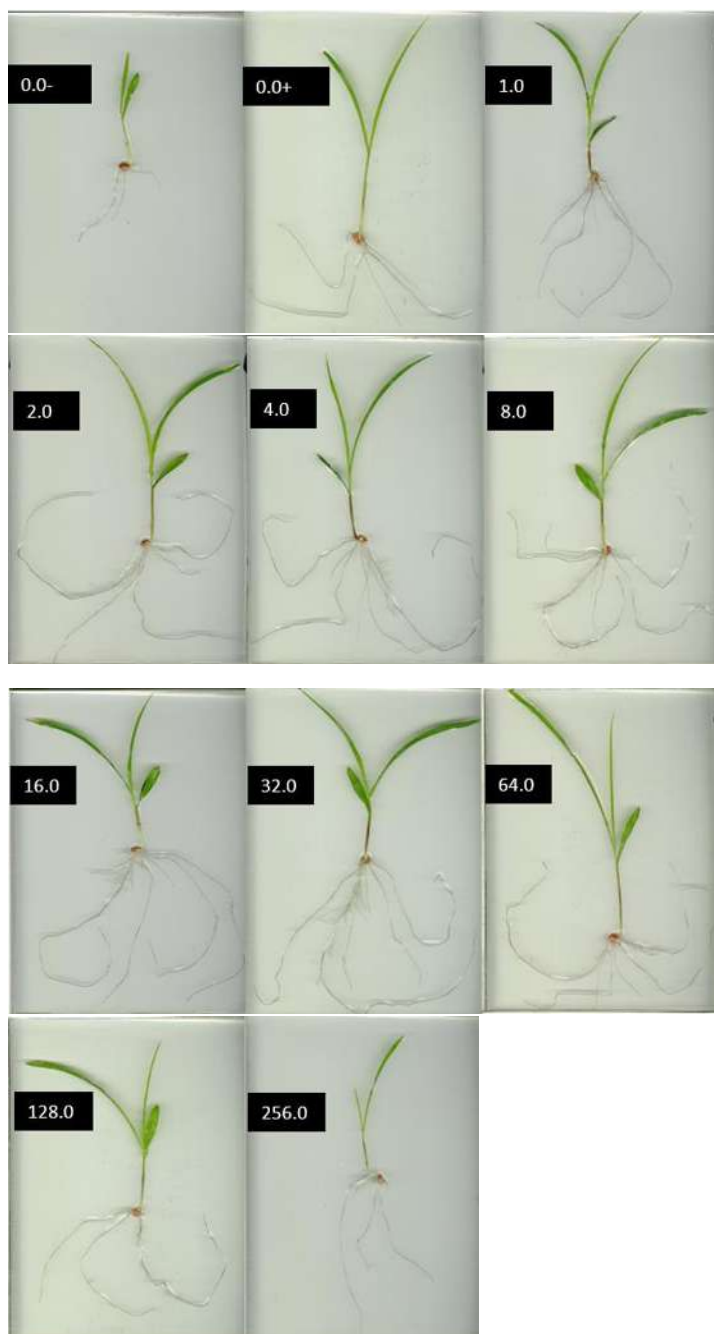


Figura 37. Plantas de maíz con NPsZnO de 21 días después de la siembra. Método de impregnado, concentraciones en los recuadros negros. (+) tratamiento con zinc convencional $ZnSO_4$ 0.86g/mL, (-) tratamiento sin zinc.

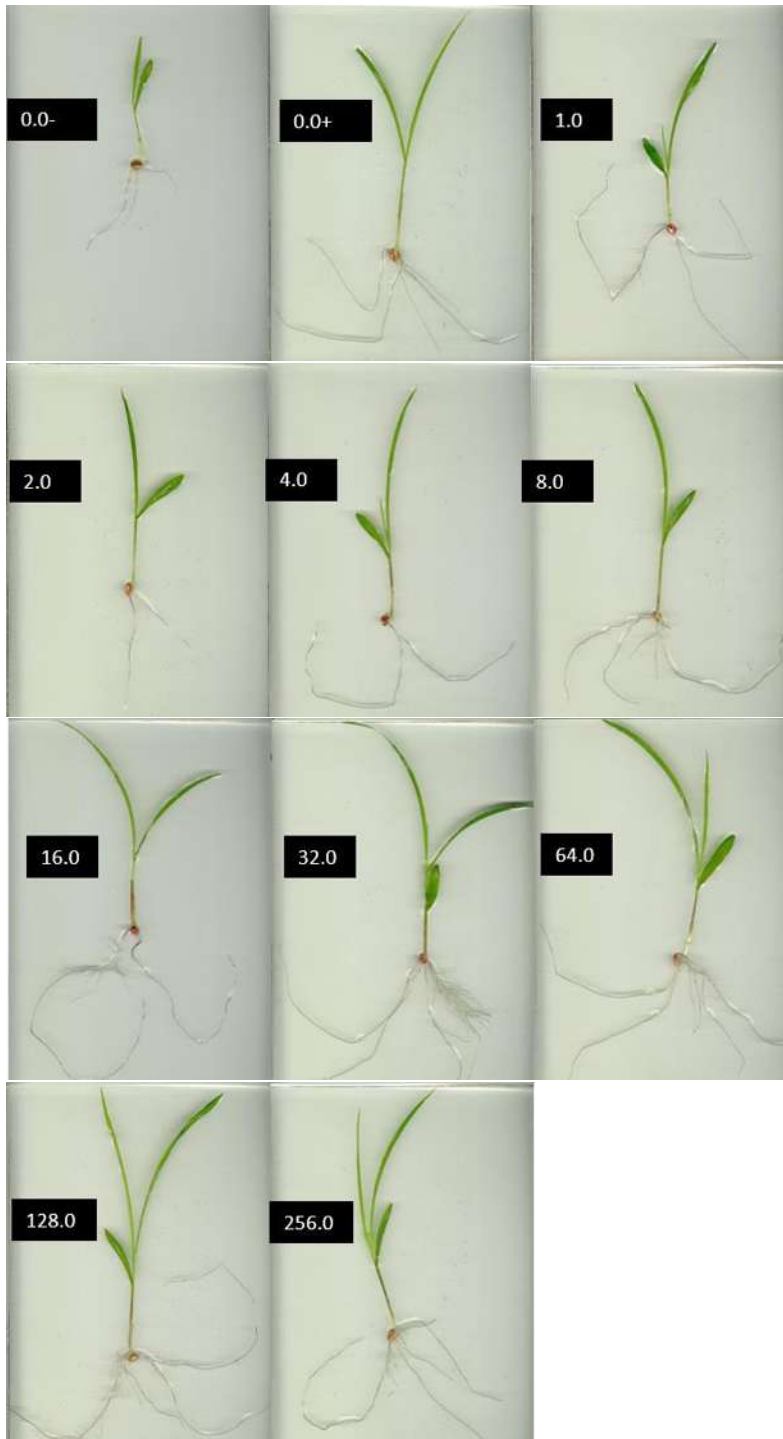


Figura 38. Plantas de maíz con NPsZnO de 21 días después de la siembra. Método de agregado en siembra. Concentraciones en los recuadros negros. (+) tratamiento con zinc convencional (-) tratamiento sin zinc.

7.9 Efecto de las nanopartículas de ZnO sobre la biomasa en plántulas de maíz

Para la obtención de la biomasa vegetal, se evaluó el efecto de las NPs en el peso fresco y en el peso seco de las plántulas de maíz.

En la figura 39 se muestra el efecto de las NPsZnO sobre el peso fresco en donde observamos que los tratamientos con 1-64 $\mu\text{g/mL}$ de NPs mostraron un incremento en el peso, en comparación con ambos controles, siendo el tratamiento con mayor desempeño el de 16 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 39A). Por otro lado, en la figura 39B, mostró que al suplementar las NPs en el momento de la siembra, no presentaron diferencia entre sí, pero sí con los controles, sin embargo, para el impregnado se obtuvieron valores en los tratamientos por encima de los 0.25 hasta los 0.31g mientras que para los tratamientos agregados en siembra de NPs de ZnO se mantiene en 0.2g con poca variación en comparación con 0.12 y 0.17 de los controles negativo y positivo respectivamente.

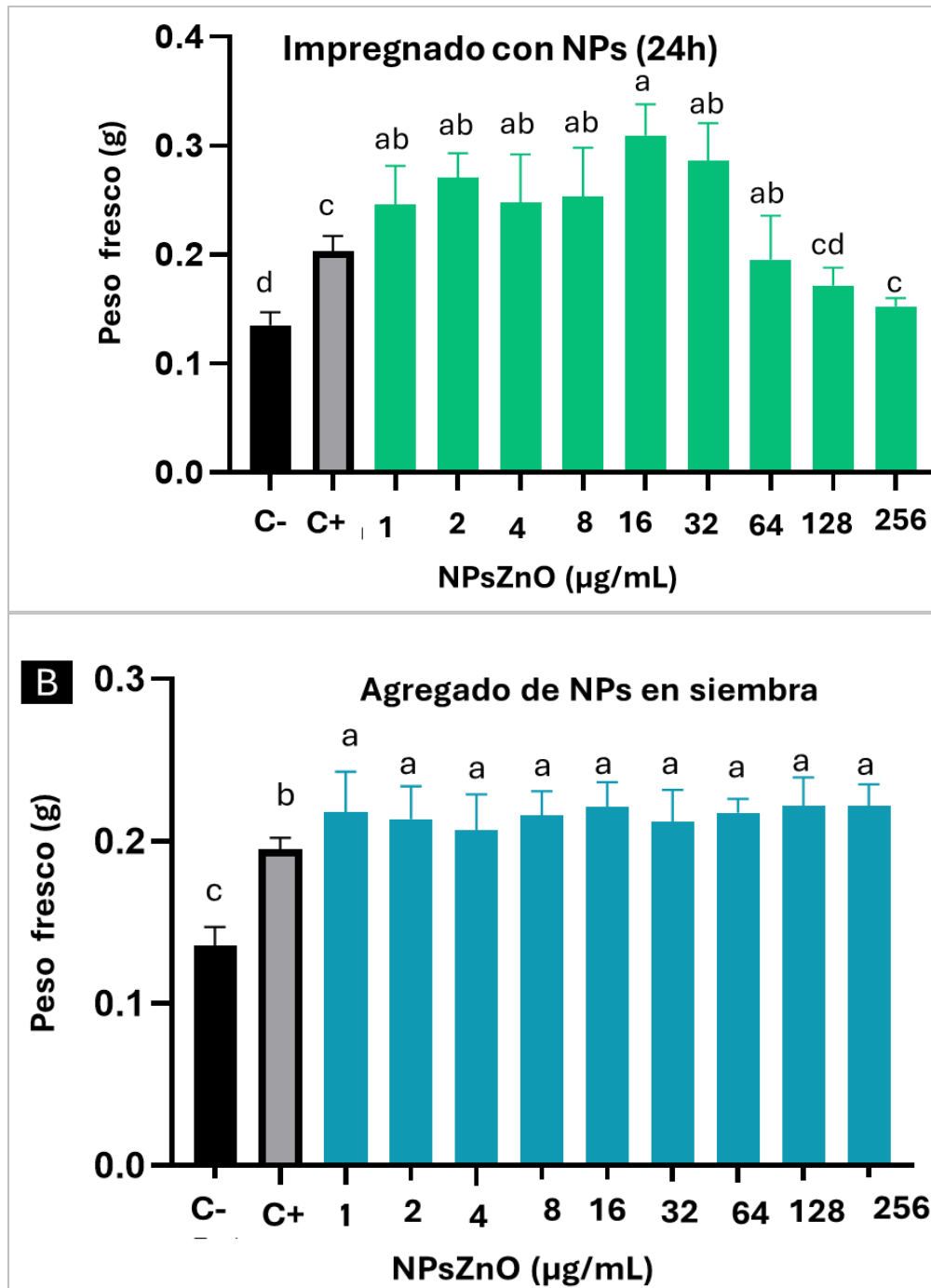


Figura 39. Peso fresco en plantas de maíz con NPsZnO 21 días después de la siembra. (A) Muestra el peso fresco en plantas impregnadas con NPsZnO mientras que (B) muestra el peso fresco obtenido en plantas con agregado de NPsZnO en la siembra. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

El efecto de los nanomateriales también fue evaluado en el peso seco de las plántulas. En la figura 40A se observan los efectos de las NPsZnO cuando las semillas fueron impregnadas previamente a la siembra, los resultados mostraron que en los tratamientos de 4-36 $\mu\text{g/ml}$ de NPs, hubo incrementos comparado con los de las plantas control, pero únicamente los tratamientos de 8 y 32 $\mu\text{g/mL}$ son estadísticamente significativos. Asimismo, al evaluar los efectos de las NPs al suplementarse al momento de la siembra, sobre el peso seco de las plántulas, puede observarse que los resultados fueron muy similares entre sí, únicamente se presentó diferencia significativa a los 16 $\mu\text{g/mL}$. Por lo que podemos decir que algunas NPs de ZnO incrementaron la biomasa seca vegetal, pero debido a que no existe una concordancia precisa es difícil asegurar el mecanismo por el que esto sucede o si en realidad se debe a factores extras que no fueron considerados.

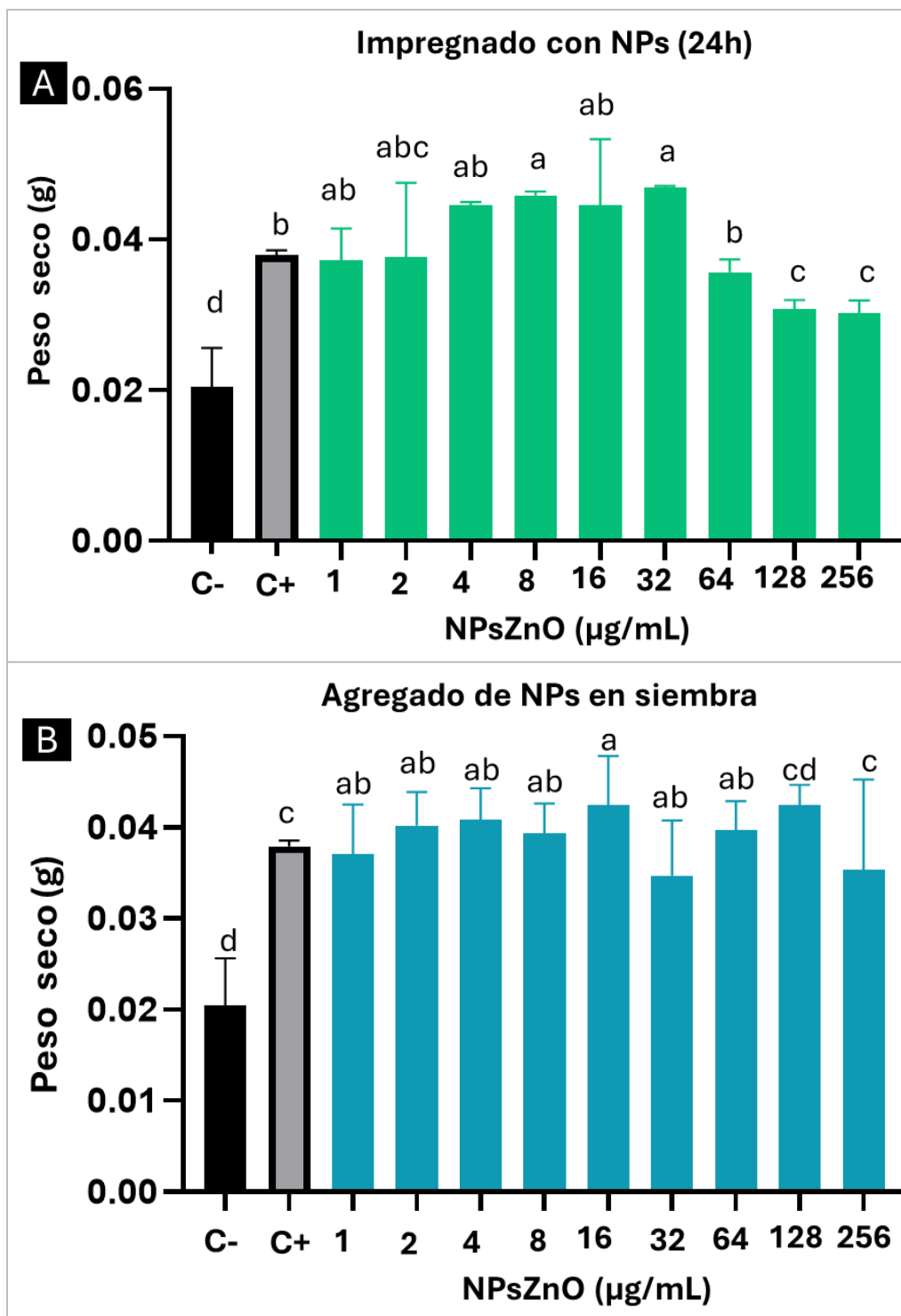


Figura 40. Peso seco obtenido en plantas de maíz 21 días después de la siembra. (A) tratamientos con método de impregnados de NPsZnO, (B) tratamientos con método de agregados en siembra de NPsZnO. Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas. $n=5$.

7.10 Bioacumulación de zinc en las plántulas de maíz expuestas a Nanopartículas

Al tomar en cuenta los biomarcadores de crecimiento, se observó un mayor desarrollo en la parte aérea, lo que puede ser ocasionado debido a que el zinc es un micronutriente móvil, lo cual lo mantiene en constante difusión hacia tejidos nuevos en las hojas, y de igual manera al mantener activos los fotosistemas, es probable que este se encuentre ubicado en ellos como antena receptora de electrones.

En la figura 41A se muestra el zinc obtenido en plantas impregnadas 24 horas con NPsZnO, existe una mayor concentración de zinc en el follaje, encontrando la mayor concentración en 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con $\sim 450\text{ppm}$, mientras que en el caso del agregado en siembra (Figura 40-B), de igual manera se encuentra la mayor concentración en el tratamiento de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin embargo, este está más cercano al control obteniendo valores de ~ 145 y ~ 100 respectivamente, por lo que podemos asegurar que las NPsZnO se acumulan de una manera más eficiente en la plántula de maíz que el zinc convencional, esto puede ser debido a que estas atraviesan con mayor facilidad por medio de canales iónicos.

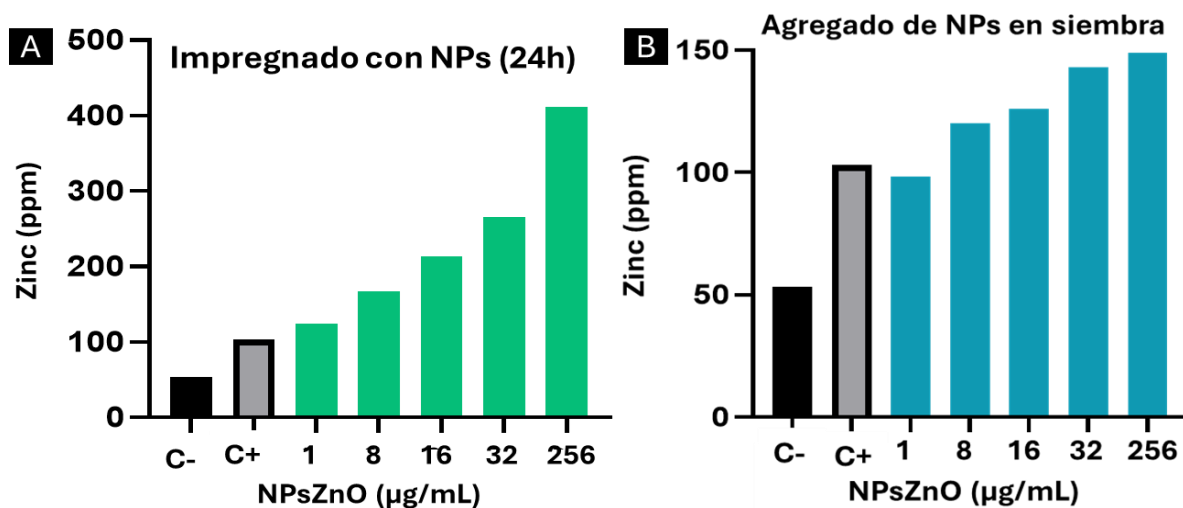


Figura 41. Cuantificación de Zinc en plántulas de maíz. A) representa las plantas con impregnado de NPsZnO en la semilla y B) el agregado en el momento de la siembra.

8. DISCUSIÓN

En esta investigación, se realizó la caracterización exhaustiva de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) que fueron sintetizadas por medio del método sol-gel. Los resultados obtenidos a través de la difracción de rayos X (DRX) revelaron picos característicos que concuerdan con los reportados en la literatura para el ZnO cristalino, lo que confirma la formación exitosa de un material cristalino usando como fuente de zinc nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) (Pérez Velasco et al., 2020). Estos hallazgos respaldan la eficiencia del método de síntesis usado para la producción de NPsZnO.

La determinación del tamaño del cristalito promedio mediante la fórmula propuesta por (Tiwari et al., 2013) y el análisis de los datos espectroscópicos arrojó un tamaño promedio de cristalito de aproximadamente 20.903 nm. Este valor está dentro del rango típico de tamaños de cristalito informados en la literatura para NPsZnO preparadas por diversos métodos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el tamaño del cristalito puede influir en las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas, así como en su comportamiento en aplicaciones específicas, como la catálisis, la fotocatalisis y la fotoluminiscencia (Ullah et al., 2018). El análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) proporcionó una visualización detallada de la morfología de las NPsZnO, revelando una forma semi ovalada con porosidad diversa. Estas características morfológicas pueden tener implicaciones significativas en la interacción de las nanopartículas con sistemas biológicos, especialmente en términos de su capacidad para atravesar membranas celulares y su biodisponibilidad en el medio ambiente. Además, la presencia de porosidad en las nanopartículas puede influir en su área superficial específica y su capacidad para adsorber y liberar moléculas bioactivas, lo que podría afectar su eficacia en aplicaciones biomédicas y ambientales (Nasrollahzadeh et al., 2019).

El análisis de la distribución del tamaño de partícula y la forma de las nanopartículas mediante ImageJ reveló un tamaño promedio de partícula de aproximadamente 72.044 nm. Esta medida es consistente con los tamaños de partícula típicamente observados en NPsZnO preparadas por métodos de síntesis similares. Es importante destacar que el tamaño y la distribución de las nanopartículas pueden

influir en su comportamiento en sistemas biológicos, incluida su capacidad para penetrar en células y tejidos, su toxicidad y su eficacia terapéutica (Nasrollahzadeh et al., 2019).

El análisis de los espectros Raman y FT-IR confirmó la composición química de las NPsZnO y la presencia de grupos funcionales característicos. Los picos espectrales observados son consistentes con los reportados previamente en la literatura para NPsZnO y proporcionan evidencia adicional de la estructura y la composición química de las nanopartículas. Estos resultados refuerzan la conclusión de que las NPsZnO sintetizadas en este estudio son químicamente puras y están bien definidas en términos de su estructura y composición (Chikkanna et al., 2019; Muhammad et al., 2019).

La interacción entre las nanopartículas y los sistemas biológicos, como las plantas de *Zea mays*, es un tema de gran interés y relevancia en la investigación actual. En este estudio, se evaluó el efecto de NPsZnO en las plantas, registrando múltiples parámetros de desarrollo, incluyendo la germinación, el crecimiento, la fotosíntesis y la acumulación de biomasa, donde un primer análisis de los datos mostró De forma general, los efectos de este compuesto varían dependiendo del método de aplicación; de tal forma que los tratamientos con semillas impregnadas con nanopartículas de zinc tuvieron un mejor desempeño que los tratamientos no impregnados. Por otra parte, los resultados de este estudio revelaron efectos significativos de las NPsZnO en el porcentaje y velocidad de germinación de las plantas de maíz. Además, la germinación de las semillas de *Zea mays* se vio promovida por concentraciones bajas de NPsZnO, lo que sugiere un efecto beneficioso de las nanopartículas en la fase inicial del ciclo de vida de la planta. Sin embargo, a concentraciones más altas, las NPsZnO mostraron un efecto inhibitorio en la germinación, lo que indica la importancia de una dosificación adecuada para evitar posibles efectos adversos (Chen et al., 2016). En términos de crecimiento vegetal, se observó un aumento significativo en el peso fresco y seco de las plantas tratadas con NPsZnO en comparación con el control. Este hallazgo sugiere una contribución de las nanopartículas en el crecimiento y desarrollo de las plantas de

maíz. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han investigado los efectos de las nanopartículas de zinc en plantas. Por ejemplo, un estudio de (Sabir et al., 2014) encontró que la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc promovió el crecimiento de las plantas de trigo al mejorar la absorción de nutrientes y la actividad enzimática.

Por otra parte, se ha documentado la deficiencia de zinc como un factor determinante en la inhibición del desarrollo de la planta y de la producción de biomasa vegetal, como consecuencia de la disminución de la fijación fotosintética de CO₂, resultado de la disminución de la actividad de la anhidrasa carbónica, enzima altamente dependiente de Zn (Sharma et al., 1994; Zhao & Wu, 2017). En este sentido, Tewari et al., (2021) han reportado, adicionando fuentes de Zinc convencional, un aumento en la actividad de la anhidrasa carbónica y de la actividad fotosintética en maíz.

En nuestro ensayo, sin embargo, la evaluación de los parámetros fotosintéticos mostró resultados variables, lo que indica que, en nuestro estudio, el efecto de las NPsZnO en la fotosíntesis pudo también depender de otros factores, incluyendo la concentración de nanopartículas, las condiciones ambientales y la forma de aplicación de estas. Palacio-Márquez et al., (2021). En este contexto, estos autores han documentado que a dosis específicas la aplicación foliar de nanopartículas de ZnO mejoran la actividad fotosintética en cultivos de frijol, favoreciendo la acumulación y producción de biomasa. Sin embargo, es importante señalar que, si bien las NP de ZnO pueden mejorar la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas, en los ensayos anteriores los autores no mencionan los mecanismos por los cuales se produce este efecto.

En varios estudios se ha informado que las nanopartículas de óxido de zinc (NP de ZnO) influyen positivamente en la arquitectura de las raíces. Por ejemplo, Sharma et al., (2022) reportaron un mayor crecimiento longitudinal de raíces en plantas de trigo (*Triticum aestivum*). De manera similar otros autores documentaron que el tratamiento con nanopartículas de óxido de zinc produce una mejora de la longitud

de las raíces en *Arachis hypogaea* L. Rajiv & Vanathi (2018,) y en raíces de brócoli Awan et al., (2020).

Sin embargo, la concentración de nanopartículas es un factor crítico, ya que tanto la deficiencia como el exceso pueden tener efectos variables en la salud de las plantas (Liu et al., 2022). Se necesitan más investigaciones para optimizar el uso de NP de ZnO en la agricultura para garantizar resultados seguros y eficaces.

Estos resultados son consistentes con estudios previos que han investigado los efectos de las nanopartículas de zinc en plantas y otros organismos. Del mismo modo, investigaciones realizadas por (Wang et al., 2016) demostraron que las nanopartículas de zinc pueden mejorar la resistencia de las plantas al estrés abiótico, como la sequía y la salinidad, al regular la expresión de genes relacionados con el estrés. Sin embargo, es importante tener en cuenta que algunos estudios también han informado efectos adversos de las nanopartículas de zinc en las plantas. Por ejemplo, la investigación de (Stampoulis et al., 2009) encontró que la exposición a altas concentraciones de nanopartículas de zinc inhibió el crecimiento de las plantas de maíz al inducir estrés oxidativo y alterar el equilibrio de nutrientes en las células vegetales.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que las nanopartículas de óxido de zinc pueden tener efectos tanto beneficiosos como adversos en el crecimiento y desarrollo de las plantas de *Zea mays*, dependiendo de factores como la concentración, el tiempo de exposición y las condiciones ambientales. Estos hallazgos son consistentes con la literatura existente y resaltan la importancia de realizar investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y los efectos a largo plazo de las NPsZnO en los sistemas biológicos.

9. CONCLUSIÓN

En este estudio, se investigó exhaustivamente la interacción entre las nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y las plantas de *Zea mays*, abordando múltiples aspectos que van desde la caracterización de las nanopartículas hasta la evaluación de su impacto en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los resultados obtenidos revelan una serie de hallazgos significativos que merecen una atención cuidadosa y una reflexión profunda.

En primer lugar, la síntesis y caracterización de las NPsZnO proporcionaron información crucial sobre su tamaño, morfología y composición, confirmando su estructura cristalina y su pureza. Este análisis fue fundamental para comprender las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas utilizadas en el estudio.

En cuanto a los efectos de las NPsZnO en las plantas de maíz, los resultados son mixtos y muestran una dependencia significativa de la concentración de nanopartículas. A concentraciones bajas, las NPsZnO demostraron promover la germinación y estimular el crecimiento de las plantas, sugiriendo un potencial uso como promotores del crecimiento en la agricultura. Sin embargo, a concentraciones más altas, las nanopartículas exhibieron efectos inhibidores en la germinación y el crecimiento, indicando una toxicidad potencial que podría limitar su aplicación práctica.

La evaluación de los parámetros de desarrollo de las plantas, como el peso fresco y seco, la longitud de la parte aérea y radical, y el número de raíces laterales, proporcionó una visión detallada de los efectos de las NPsZnO en el crecimiento vegetal. Los resultados revelaron una respuesta dosis-dependiente, con mejoras significativas observadas a dosis bajas y efectos negativos a dosis altas, lo que sugiere la importancia de una gestión cuidadosa de la dosificación al utilizar nanopartículas en la agricultura.

Además, se identificaron posibles mecanismos subyacentes de acción de las NPsZnO, incluida su capacidad para alterar la absorción de nutrientes por parte de las plantas y afectar la fisiología celular. Estos hallazgos resaltan la necesidad de

una comprensión más profunda de los mecanismos de toxicidad y los posibles efectos a largo plazo de las nanopartículas en los ecosistemas agrícolas.

En última instancia, este estudio destaca la importancia de abordar de manera integral los desafíos y oportunidades asociados con el uso de nanotecnología en la agricultura. Si bien las NPsZnO muestran un potencial prometedor para mejorar el rendimiento de los cultivos, es fundamental realizar evaluaciones de riesgos y estudios de seguridad ambiental para garantizar un uso responsable y sostenible de estas tecnologías.

En conclusión, este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones en el campo de la nanotecnología agrícola, al tiempo que subraya la necesidad de un enfoque precautorio y basado en la evidencia para maximizar los beneficios y minimizar los riesgos de las nanopartículas en la agricultura moderna.

10. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

- Awan, B., Sabeen, M., Shaheen, S., Mahmood, Q., Ebadi, A., & Toughani, M. (2020). Phytoremediation of zinc contaminated water by marigold (*Tagetes Minuta* L). *Central Asian Journal of Environmental Science and Technology Innovation*, 1(3), 150-158.
- Batsmanova, L. M., Gonchar, L. M., Taran, N. Y., & Okanenko, A. A. (2013). *Using a Colloidal Solution of Metal Nanoparticles as Micronutrient Fertiliser for Cereals* (Vol. 2, Issue 4).
- Boex-Fontvieille, E., Daventure, M., Jossier, M., Zivy, M., Hodges, M., & Tcherkez, G. (2013). Photosynthetic Control of Arabidopsis Leaf Cytoplasmic Translation Initiation by Protein Phosphorylation. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070692>
- Botero, J. S., Navarro, S., Giraldo, N., & Atehortúa, L. (n.d.). *Estimation of Photosynthetically Active Radiation Using a Low Cost Spectrometer*.
- Chen, X., O'Halloran, J., & Jansen, M. A. K. (2016). The toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Lemna minor* (L.) is predominantly caused by dissolved Zn. *Aquatic Toxicology*, 174, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.012>
- Chikkanna, M. M., Neelagund, S. E., & Rajashekarappa, K. K. (2019). Green synthesis of Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and their biological activity. *SN Applied Sciences*, 1(1). <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0095-7>
- Chong, C. R., & Auld, D. S. (2007). Catalysis of zinc transfer by D-penicillamine to secondary chelators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(22), 5524–5527. <https://doi.org/10.1021/jm070803y>
- Cisneros, G. J., Ochoa-Barragán, R., Kumar-Tiwari, D., Sánchez-Yáñez, J. M., & Villegas-Moreno, J. (2023). Synthetic Multi-walled Carbon Nanotubes Affect *Arabidopsis thaliana* Growth through Blocking the TOR Signaling Pathway. *Microscopy and Microanalysis : The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 29(1), 15–18. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozad067.007>
- Deng, K., Dong, P., Wang, W., Feng, L., Xiong, F., Wang, K., Zhang, S., Feng, S., Wang, B., Zhang, J., & Ren, M. (2017). The TOR pathway is involved in adventitious root formation in *Arabidopsis* and potato. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00784>
- Dobrenel, T., Mancera-Martínez, E., Forzani, C., Azzopardi, M., Davanture, M., Moreau, M., Schepetilnikov, M., Chicher, J., Langella, O., Zivy, M., Robaglia, C., Ryabova, L. A., Hanson, J., & Meyer, C. (2016). The *Arabidopsis* TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Frontiers in Plant Science*, 7(November 2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01611>
- Dong, P., Xiong, F., Que, Y., Wang, K., Yu, L., Li, Z., & Ren, M. (2015). Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6(September). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00677>

- Eide, D. J. (2011). The oxidative stress of zinc deficiency. In *Metallomics* (Vol. 3, Issue 11, pp. 1124–1129). <https://doi.org/10.1039/c1mt00064k>
- Escudero-Almanza, D. J., Leopoldina Ojeda-Barrios, D., Adriana Hernández-Rodríguez, O., Sánchez Chávez, E., Ruíz-Anchondo, T., & Sida-Arreola, J. P. (n.d.). P REVIEW CARBONIC ANHYDRASE AND ZINC IN PLANT PHYSIOLOGY Carbonic anhydrase (CA) (EC: 2.4.1. In *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH* (Vol. 72, Issue 1).
- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S. T., & Hayat, S. (2018). Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*, 56(2), 678–686. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0717-0>
- Fonseca, B. D., Graber, T. G., Hoang, H. D., González, A., Soukas, A. A., Hernández, G., Alain, T., Swift, S. L., Weisman, R., Meyer, C., Robaglia, C., Avruch, J., & Hall, M. N. (2016). Evolution of TOR and translation control. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* (pp. 327–411). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8_15
- Govorov, A. O., & Carmeli, I. (2007). Hybrid structures composed of photosynthetic system and metal nanoparticles: Plasmon enhancement effect. *Nano Letters*, 7(3), 620–625. <https://doi.org/10.1021/nl062528t>
- Guil Guerrero, J. L., Giménez Martínez, J. J., & Torija Isasa, M. E. (1998). *Mineral Nutrient Composition of Edible Wild Plants*.
- Hao, Y., Yuan, W., Ma, C., White, J. C., Zhang, Z., Adeel, M., Zhou, T., Rui, Y., & Xing, B. (2018). Engineered nanomaterials suppress Turnip mosaic virus infection in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *Environmental Science: Nano*, 5(7), 1685–1693. <https://doi.org/10.1039/c8en00014j>
- Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. In *Genes and Development* (Vol. 25, Issue 18, pp. 1895–1908). <https://doi.org/10.1101/gad.17420111>
- Heitman, J., Mowva, N. R., & Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253(5022), 905–909. <https://doi.org/10.1126/science.1715094>
- Jiménez-López, S., Mancera-Martínez, E., Donayre-Torres, A., Rangel, C., Uribe, L., March, S., Jiménez-Sánchez, G., & Sánchez De Jiménez, E. (2011). Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: Translational regulation of ribosomal protein mRNAs. *Plant and Cell Physiology*, 52(10), 1719–1733. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr114>
- Khan, A. (2010). Raman Spectroscopic Study of the ZnO Nanostructures. In *J Pak Mater Soc* (Vol. 4, Issue 1).
- Kravchenko, A., Citerne, S., Jéhanno, I., Bersimbaev, R. I., Veit, B., Meyer, C., & Leprince, A. S. (2015). Mutations in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis. *Biochemical*

and *Biophysical Research Communications*, 467(4), 992–997.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.028>

- Lahiani, M. H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. v. (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(16), 7965–7973. <https://doi.org/10.1021/am402052x>
- Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Hao, H., Xiaoqing, L., & Fashui, H. (2007). Effects of nano-anatase on spectral characteristics and distribution of LHCII on the thylakoid membranes of spinach. *Biological Trace Element Research*, 120(1–3), 273–283. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8025-3>
- Lira-Saldivar, R. H., Argüello, B. M., Villarreal, G. D. los S., & Reyes, I. V. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*, 28(2), 9–24. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1575>
- Liu, L., Nian, H., & Lian, T. (2022). Plants and rhizospheric environment: Affected by zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs). A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 185, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.05.032>
- Liu, R., & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. In *Science of the Total Environment* (Vol. 514, pp. 131–139). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.104>
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 307–318). <https://doi.org/10.1038/nrm2672>
- Mahfouz, M. M., Kim, S., Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (2006). Arabidopsis TARGET of RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*, 18(2), 477–490. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035931>
- Martin, D. E., & Hall, M. N. (2005). The expanding TOR signaling network. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 158–166). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.02.008>
- Masci, C., Ruquet, V., Corbetta, C., Zanettini, J. L., Kugler, I. A. W., Aer, ", & Mayo, D. (2020). *Maíz para grano, comparación de híbridos en 25 de Mayo Estación Experimental Agropecuaria Pergamino*.
- Mcfadden, G. I. (2001). *Chloroplast Origin and Integration 1*. www.plantphysiol.org
- Mendoza, G., & Luis Rodríguez-López, J. (n.d.). *La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso*.
- Montané, M. H., & Menand, B. (2013). ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *Journal of Experimental Botany*, 64(14), 4361–4374. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert242>

- Moreau, M., Azzopardi, M., Clément, G., Dobrenel, T., Marchive, C., Renne, C., Martin-Magniette, M. L., Taconnat, L., Renou, J. P., Robaglia, C., & Meyer, C. (2012). Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell*, 24(2), 463–481. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091306>
- Muhammad, W., Ullah, N., Haroon, M., & Abbasi, B. H. (2019). Optical, morphological and biological analysis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using: *Papaver somniferum* L. *RSC Advances*, 9(51), 29541–29548. <https://doi.org/10.1039/c9ra04424h>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., & Issaabadi, Z. (2019). An Introduction to Nanotechnology. In *Interface Science and Technology* (Vol. 28, pp. 1–27). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>
- Palacio-Márquez, A., Ramírez-Estrada, C. A., Gutiérrez-Ruelas, N. J., Sánchez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Chávez-Mendoza, C., & Sida-Arreola, J. P. (2021). Efficiency of foliar application of zinc oxide nanoparticles versus zinc nitrate complexed with chitosan on nitrogen assimilation, photosynthetic activity, and production of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Horticulturae*, 288, 110297. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110297>
- Pérez Velasco, E. A., Galindo, R. B., Valdez Aguilar, L. A., González Fuentes, J. A., Puente Urbina, B. A., Lozano Morales, S. A., & Valdés, S. S. (2020). Effects of the morphology, surface modification and application methods of ZnO-NPs on the growth and biomass of tomato plants. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061282>
- Quilichini, T. D., Gao, P., Pandey, P. K., Xiang, D., Ren, M., & Datla, R. (2019). A role for TOR signaling at every stage of plant life. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 70, Issue 8, pp. 2285–2296). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz125>
- RAJIV, P.; VANATHI, P. Effect of Parthenium based vermicompost and zinc oxide nanoparticles on growth and yield of *Arachis hypogaea* L. in zinc deficient soil. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 2018, vol. 13, p. 251-257. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.006>
- Rakesh Kumar, S. K., Magan Singh, P. K., Govind Makarana, P. G. S., & Manish Kushwaha, D. J. (2017). C4 Photosynthesis and Biomass. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 1567–1574. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.180>
- Rodriguez, M., Parola, R., Andreola, S., Pereyra, C., & Martínez-Noël, G. (2019). TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: Do they always act according to the “yin-yang” model? In *Plant Science* (Vol. 288). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110220>
- Ronaldo Silva, A., Ximena Nuñez Rodriguez, L., da Conceição Oliveira Macedo, F., Barbosa da Silva, F., Silva Daneluzzi, G., & Ferraz de Oliveira, R. (n.d.). *EFEITO DAS NANOPARTICULAS DE SILICIO NA FOTOSSÍNTESE DO TOMATEIRO SOB ESTRESSE SALINO*.
- Ryabova, L. A., Robaglia, C., & Meyer, C. (2019). Target of Rapamycin kinase: Central regulatory hub for plant growth and metabolism. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 70, Issue 8, pp. 2211–2216). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz108>

- Sabir, S., Arshad, M., & Chaudhari, S. K. (2014). Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: Synthesis and applications. In *Scientific World Journal* (Vol. 2014). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2014/925494>
- Sato-Berrú, R. Y., Vázquez-Olmos, A., Fernández-Osorio, A. L., & Sotres-Martínez, S. (2007). Micro-Raman investigation of transition-metal-doped ZnO nanoparticles. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(9), 1073–1076. <https://doi.org/10.1002/jrs.1658>
- Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., & Ryabova, L. A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO Journal*, 32(8), 1087–1102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>
- Song, Y., Alyafei, M. S., Masmoudi, K., Jaleel, A., & Ren, M. (2021). Contributions of tor signaling on photosynthesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22168959>
- Sharma, P. N., Kumar, N., Bisht, S. S. (1994): Effect of zinc deficiency on chlorophyll content, photosynthesis and water relations of cauli-flower plants. *Photosynthetica* 30, 353–359.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., & White, J. C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science and Technology*, 43(24), 9473–9479. <https://doi.org/10.1021/es901695c>
- Tewari, R. K., Kumar, P., & Sharma, P. N. (2019). An effective antioxidant defense provides protection against zinc deficiency-induced oxidative stress in Zn-efficient maize plants. *Journal of plant nutrition and soil science*, 182(5), 701-707. <https://doi.org/10.1002/jpln.201800622>
- Tiwari, D. K., Villaseñor-Cendejas, L. M., & Thakur, A. K. (2013). Magnetic properties of nanocrystalline nickel-cobalt ferrites (Ni_{1/2}Co_{1/2}Fe₂O₄). *International Journal of Thermophysics*, 34(8–9), 1838–1843. <https://doi.org/10.1007/s10765-013-1438-7>
- Ullah, N., Mansha, M., Khan, I., & Qurashi, A. (2018). Nanomaterial-based optical chemical sensors for the detection of heavy metals in water: Recent advances and challenges. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 100, pp. 155–166). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.01.002>
- Wang, Z., Wang, S., Ma, T., Liang, Y., Huo, Z., & Yang, F. (2023). Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Applications in Enhancing Plant Stress Resistance: A Review. *Agronomy*, 13(12), 3060. <https://doi.org/10.3390/agronomy13123060>
- Wang, X., Yang, X., Chen, S., Li, Q., Wang, W., Hou, C., Gao, X., Wang, L., & Wang, S. (2016). Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 6(JAN2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>
- Wu, Y., Shi, L., Li, L., Fu, L., Liu, Y., Xiong, Y., & Sheen, J. (2019). Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 70, Issue 8, pp. 2227–2238). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz028>

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496(7444), 181–186.
<https://doi.org/10.1038/nature12030>

Xiong, Y., & Sheen, J. (2012). Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2836–2842.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.300749>

Yang, F., Hong, F., You, W., Liu, C., Gao, F., Wu, C., & Yang, A. P. (2006). *Influences of Nano-anatase TiO 2 on the Nitrogen Metabolism of Growing Spinach*

Zhao, K., Wu, Y. (2017): Effects of Zn deficiency and bicarbonate on the growth and photosynthetic characteristics of four plant species. *Plos One* 12. DOI:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169812>

ANEXO A

El análisis DRX no solo nos da la oportunidad de comparar materiales como en este caso el zinc para su identificación, también nos permite mediante el uso de la trigonometría y la reflexión, determinar el tamaño de los cristales que conforman la nanopartícula, mediante los ángulos que esta presenta en su forma. A continuación, se muestra un ejemplo para la obtención de este valor.

Partiendo de la siguiente formula:

$$\text{Tamaño del Cristalito (promedio en \AA)} = \frac{K\lambda}{B \cos \theta}$$

Dónde:

- θ : La mitad del ángulo de Bragg (radianes).
- λ : Longitud de onda de los rayos x utilizados.
- K: Factor de forma adimensional, normalmente 0.9 (asume cristaliticos esféricos) pero varia con la forma real del cristalito.
- B: Línea que se ensancha a la mitad de la intensidad máxima (FWHM), después de restar la línea instrumental que se ensancha.

Mientras que para calcular "FWHM" (Full width at Half Maximum) se realiza mediante la siguiente evaluación en el espectro correspondiente, el cual observamos en la figura 10.

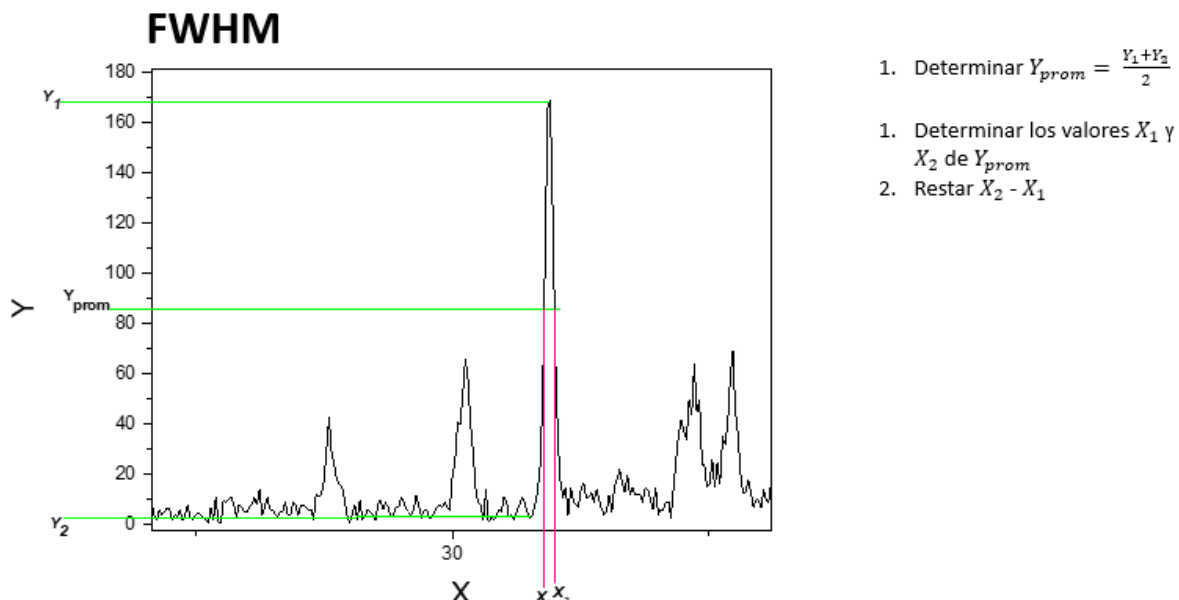


Figura 42. Determinación de FWHM. Espectro tomado como ejemplo para la obtención de los valores necesarios en FWHM que forman parte del cálculo para el tamaño de Cristalito.

$$\text{Tamaño del Cristalito (average in \AA)} = \frac{K\lambda}{B \cos \theta}$$

Sustituyendo los valores que se obtiene del espectro de la figura 10 en el pico "A", "B" y "C" en la formula anterior encontramos los siguientes valores:

$$\text{Tamaño del pico A } \frac{(0.9)(1.540598)}{(0.27^\circ)(2) \cos 0.27} = 30.49$$

$$\text{Tamaño del pico B } \frac{(0.9)(1.540598)}{(0.27^\circ)(2) \cos 0.87} = 9.60$$

$$\text{Tamaño del pico C } \frac{(0.9)(1.540598)}{(0.27^\circ)(2) \cos 0.41} = 22.62$$

Obteniendo un promedio de Cristalito de 20.903 u.a.

Por lo que se determina que la síntesis de nanopartículas por medio del método sol-gel arroja ZnO con un tamaño promedio del cristalito de 20.903 nm.