

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Evaluación de los efectos producidos por materiales
nanoestructurados (Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$) en plantas

TESIS QUE PRESENTA

Cristina Garcidueñas Piña

PARA OBTENER EL GRADO DE

Doctorado en Ciencias Biológicas

Comité Tutorial:

Dra. Iliana E. Medina Ramírez

Dr. Plinio A. Guzmán Villate

Dr. Roberto Rico Martínez

Aguascalientes, Ags. 25 de noviembre del 2016

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



CRISTINA GARCIDUEÑAS PIÑA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Evaluación de los efectos producidos por materiales nanoestructurados ($\text{TiO}_2@Ag$ y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$) en plantas”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 25 de octubre de 2016

“Se lumen proferre”

EL DECANO


M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

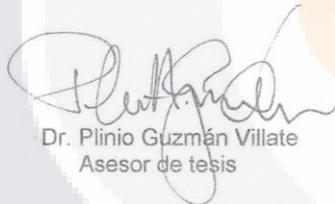
Por medio de la presente, como Comité Tutoral designado de la estudiante **CRISTINA GARCIDUEÑAS PIÑA** con ID **7391** quien realizó *la tesis* titulada: **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR MATERIALES NANOESTRUCTURADOS (TiO₂@Ag y TiO₂-Cu²⁺) EN PLANTAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

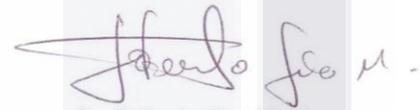
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a de octubre del 2016


Dra. Iliana E. Medina Ramírez
Tutor de tesis


Dr. Plinio Guzmán Villate
Asesor de tesis


Dr. Roberto Rico Martínez
Asesor de tesis

c.c.p.- M. en C. Cristina Garcidueñas Piña
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Dra. Consolación Martínez - Secretario Técnico

CARTA DE ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO

Dear Dr. Medina-Ramirez,

The review process of Research Article 757629 titled "Evaluation of the antimicrobial activity of nano-structured materials of titanium dioxide doped with silver and/or copper and their effects in Arabidopsis thaliana" by Cristina Garcidueñas-Piña, Iliana Ernestina Medina-Ramirez, Plinio A. Guzmán-Villate, Roberto Rico-Martinez, José Francisco Morales-Domínguez and Isidoro Rubio-Franchini submitted to International Journal of Photoenergy has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The special issue for which the paper is being processed is

"Photocatalysis in Environment, Energy, and Sustainability"

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/757629/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to International Journal of Photoenergy.

Best regards,

Patrick S. M. Dunlop

psm.dunlop@ulster.ac.uk

30 march 2016

Research Article

Evaluation of the Antimicrobial Activity of Nanostructured Materials of Titanium Dioxide Doped with Silver and/or Copper and Their Effects on *Arabidopsis thaliana*

Cristina Garcidueñas-Piña,¹ Iliana E. Medina-Ramírez,¹
Plinio Guzmán,² Roberto Rico-Martínez,¹
José Francisco Morales-Domínguez,¹ and Isidoro Rubio-Franchini³

¹Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad No. 940, Ciudad Universitaria, 20131 Aguascalientes, AGS, Mexico

²Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, 36821 Irapuato, GTO, Mexico

³Laboratorio Estatal de Salud Pública, Departamento de Control Ambiental, Instituto de Servicios de Salud del Estado de Aguascalientes (ISSEA), Avenida Siglo XXI No. 105, Ciudad Satélite Morelos, 20298 Aguascalientes, AGS, Mexico

Correspondence should be addressed to Iliana E. Medina-Ramírez; iemedina@correo.uaa.mx

Received 23 October 2015; Revised 14 February 2016; Accepted 30 March 2016

Academic Editor: Patrick S. M. Dunlop

Copyright © 2016 Cristina Garcidueñas-Piña et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Nanostructured materials (NSMs) of silver (Ag@TiO_2) and copper ($\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$) doped titanium dioxide were synthesized, fully characterized, and evaluated for their antimicrobial efficiency and effects on *Arabidopsis thaliana*. The NSMs were prepared using an environmentally benign route. The physicochemical properties of the materials were determined with analytical techniques. These materials are active under visible light, exhibit a small size (10–12 nm), are crystalline (anatase), and liberate metal ions (Ag^+ and Cu^{2+}) in solution. Microbicide activity was observed in *E. coli* C600 and *S. cerevisiae* W303 strains treated with several concentrations of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, radiated and nonradiated, and after different times. Higher inactivation was achieved with Ag@TiO_2 in *E. coli*, with value of log inactivation of 2.2 with 0.5 mg/mL after 4 h, than in *S. cerevisiae*, with a log inactivation of 2.6 with 10 mg/mL after 24 h. The impact of these NSMs in plants was evaluated in *Arabidopsis thaliana* Col-0 strain exposed to such materials at different conditions and concentrations, and physical and biochemical effects were analyzed. Seeds exposed to NSMs did not show effects on germination and growth. However, seedlings treated with these materials modified their growth and their total chlorophyll content.

1. Introduction

Nanostructured materials (NSMs) have become the focus of numerous investigations due to their unique physicochemical properties which are different from the same materials with larger dimensions [1]; these properties have been exploited for the development of several new products with different technological and medical applications [2, 3]. Lately, engineered NSMs can be produced with specific physicochemical properties for advanced applications. Some of these NSMs

have demonstrated microbicide activity and are being used as disinfectants for water purification, with several advantages over the traditional water disinfection technologies. Researchers have a special interest in metal/semiconductor oxide composites since they have been shown to be efficient bifunctional materials, which can be used in numerous physical, biological, biomedical, and pharmaceutical applications [4]. Among the various materials, titanium dioxide (TiO_2) has been widely studied because of its chemical stability, low toxicity, abundance, and excellent photocatalytic activity [5].

It has also been demonstrated that coupling TiO_2 with noble metals renders visible light active materials with increased photocatalytic and photoelectrochemical responses of the composite material by reducing the fast recombination of the photogenerated charge carriers [6, 7]. It has been demonstrated that Ag@TiO_2 efficiently removes several pathogenic microorganisms from water, air, and surfaces [8–11]; however, the ecological impact of this material has been scarcely studied [12–14]. Although to a lesser extent than Ag@TiO_2 composites, the bactericidal effect of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ materials has been lately investigated [15–17]. We have been working on the implementation of green routes for the synthesis of metal doped NSMs with enhanced activity [18–20]. Ag@TiO_2 and/or $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ synthesized by that methodology need a systematic study of characterization, photocatalytic activity, antimicrobial activity, and toxicological impact. The study of the antimicrobial activity in model organisms has the advantage of obtaining results in a reproducible, easy, cheap, and fast way. *Escherichia coli* C600 strain is a harmless gram negative bacterium of easy handling in the laboratory. Furthermore, *Saccharomyces cerevisiae* W303a strain is a fungus unicellular yeast with a comparable lifespan to that of *E. coli*. Therefore, both microorganisms were selected to study antimicrobial activity of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ to determine the range of effective antimicrobial concentrations. The seeds disinfection like potential use of these materials was considered, so that the antimicrobial activity was evaluated in seeds and in fungal contaminants seeds too.

The impact of interaction of plants with NSMs is becoming a priority since plants can serve as reservoirs of NSMs, and plants are directly exposed to soil, water, and air, where NSMs could be dispersed. As a result of that interaction, uptake and accumulation of NSMs is likely to take place giving rise to deleterious effects in plants or they may become one of the main routes of exposure to NSMs for higher species [21]. Despite the preliminary efforts to determine the potential hazard of NSMs in plants, currently published results are contradictory regarding phytotoxicity of NSMs. For instance, Shaw and Hossain [22] reported that the interaction of NSMs (CuO) with plants affects their development and productivity, whereas Li and coworkers [23] indicate that the interaction of NSMs (Fe_3O_4) with watermelon seedlings is beneficial, since increased accumulation of chlorophyll is observed. In the same direction, Kole and coworkers [24] reported on the effects of seed treatment with fullerol NSMs that resulted in increasing plant biomass, fruit yield, and phytomedicine content in bitter melon; thus, the authors suggest the use of fullerol for crop improvement. In view of the contradictory findings described in the above-mentioned reports and due to the lack of standards and guidance for NSMs toxicity evaluation, it is evident that many technical challenges must be surpassed to achieve objective information regarding toxicity evaluation of NSMs. *Arabidopsis thaliana* is being used as model organism, because of its small size, little space requirements, and short life cycle. Its small seed size results in a relatively large surface area to volume ratio, which is conducive to higher sensitivity to toxicants. *A. thaliana* is also the first plant to have its genome sequenced, which

facilitates future work on its molecular response to NSMs [25]. Therefore, the goals of this work are as follows: (a) to report on the synthesis and characterization of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, (b) to evaluate the antimicrobial activity of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ in two model organisms: *E. coli* and *S. cerevisiae* and in fungi isolated from seeds, and (c) to analyze the effects of the interaction of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ on *A. thaliana*.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis and Characterization of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$

2.1.1. Synthesis of NSMs. Ag@TiO_2 were synthesized according to previously reported protocol by our research group [18]. $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ were synthesized following the similar procedure for Ag@TiO_2 materials, with slight modifications: in a flask, copper sulfate (CuSO_4) was dissolved in acetic acid ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) and titanium isopropoxide $\text{Ti}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_4$ was added slowly and stirred continuously. Arabic gum was added and the mixture was dried in a heating mantle and then thermally treated in a furnace at 350°C for 3 h. The resulting powders were washed with a mixture of $\text{H}_2\text{O}:\text{ethanol}$ (3:1) and allowed to dry.

2.1.2. Characterization of NSMs. The $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ were characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy-energy dispersive spectrometry (SEM-EDS), dynamic light scattering, and atomic absorption spectroscopy (AAS). The powder XRD patterns of the samples were recorded in a Bruker D Advance Diffractometer using Cu K_α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) at a scanning rate of $0.05^\circ/\text{min}$ for 2θ ranging from 10° to 85° . The XRD patterns were analyzed using standard ICDD files. The average particle size distribution in the samples was measured by dynamic light scattering using a Malvern particle size analyzer. The particle surface charge of the samples was analyzed by measuring the ζ potential of the samples.

2.2. Evaluation of Antimicrobial Activity of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. The antimicrobial activity of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ was investigated in the bacterium *E. coli* strain C600 (F-tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ -) and the yeast *S. cerevisiae* strain W303 (MATa/MAT α {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} [phi+]), both laboratory strains and model organisms. They were cultivated using standard microbiological techniques. *E. coli* C600 was cultured on LB (Luria-Bertani) and *S. cerevisiae* W303 in PD (Potato-Dextrose) solid media. A colony was taken and inoculated in 5 mL of liquid medium and incubated for 24 h under stirring at 37°C for *E. coli* and 28°C for *S. cerevisiae*. Then, a volume of 1.5 mL of the culture was placed in a microcentrifuge tube and centrifuged at 12,000 rpm for 5 min; the supernatant was removed and the pellet was suspended in sterile potassium phosphate buffer 0.05 M pH 7. This microbial suspension was diluted to obtain a title of 10^6 CFU/mL (colony forming units per milliliter) for *E. coli* C600 and 10^4 CFU/mL for *S. cerevisiae* W303. A volume of 1 mL of

TABLE 1: Treatments of exposition of *A. thaliana* to NSM.

Treatment	<i>A. thaliana</i>	Exposure medium	Exposure time	Parameter
1	Seeds	H ₂ O distilled Phosphate buffer pH 5.7	24 h	Germination and development
2	Seeds-seedlings	H ₂ O distilled MS liquid	1 week	Elongation of seedling
3	Two-day-old seedlings	H ₂ O distilled	24 h	Elongation of seedling

Exposure media were supplemented with 0, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 mg/mL of NSM (Ag@TiO₂ or TiO₂-Cu²⁺), 0.015 mM Ag⁰, or 1 mM CuSO₄.

the microorganism suspension was placed in test tube and NSMs were added to have concentrations of 0.00, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 mg/mL. Colloidal silver BacDyn Plus® 0.015 mM, a commercial disinfectant (Ag⁰), and CuSO₄ (1 mM) were used as controls. The suspensions were mixed and incubated at 25°C with shaking at 150 rpm. The inactivation of microorganisms (MOs) was measured at different time intervals (2, 4, 6, 8, and 24 h). To evaluate the antimicrobial effect of metal (Ag⁰ or Cu²⁺), some suspensions were incubated in the dark; to demonstrate the synergistic effect of NSMs (metal + photocatalysis), other suspensions were incubated under radiation (8 ft., 75-Watt cool white linear fluorescent light bulb). After incubation, aliquots of suspensions were inoculated in solid medium (LB for *E. coli* C600 and PD for *S. cerevisiae* W303) and after incubation the number of colonies was counted to calculate the surviving number of CFU/mL. The log inactivation was calculated as $\log_{10}(N/N_0)$, where N_0 represent the initial CFU/mL and N the CFU/mL surviving to treatment. Experiments were performed in triplicate and sterile conditions were maintained.

2.3. Evaluation of the Antimicrobial Action of Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺ for Crop Protection. To evaluate the efficiency of NSMs (Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺) for microbial control in crop protection, treatment of fungal pathogens *in vitro* and disinfection of *A. thaliana* seeds were examined. The efficiency of NSMs for disinfection of *A. thaliana* seeds was investigated with different conditions. The biological material (50 seeds) was exposed to NSMs (10 mg/mL of Ag@TiO₂ or TiO₂-Cu²⁺) and the effect of the pretreatment of the seeds (previous exposition to NSMs) with ethanol (70% v/v) solution or Tween (0.15% w/v) was also evaluated. Treatment with sodium hypochlorite and Tween 20 (common disinfection agents) was used as positive control, and sterile H₂O was used as negative control. Experiments were performed in triplicate and sterile conditions were maintained.

An *in vitro* assay was conducted to assess the capacity for the treatment of plant pathogens of the NSMs under study; thus, microorganisms were isolated from *A. thaliana* seeds and exposed to disinfection agent at different concentrations using a sterile potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 7). The suspensions were incubated at 25°C in a shaker incubator under visible light for 24 h. After that, 100 μL of the suspension was spread in PD agar and incubated at 25°C for 3 days.

Antifungal activity of NSMs was evaluated using two fungal species (isolated microorganisms from nondisinfected seeds of *A. thaliana* cultured *in vitro*): *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. fungi (1000 spores/mL) and NSMs (10 mg/mL of Ag@TiO₂ or TiO₂-Cu²⁺) were incubated under visible light for 24 h at 25°C. After that, 10 μL aliquot of the suspensions was placed in PD agar medium and incubated at 25°C for 3 days. Growth inhibition was measured by calculating radial inhibition against control group. Experiments were conducted in triplicate. Radial inhibition (RI%) was calculated in accordance with the following equation [26]:

$$RI\% = \frac{(D - d) \times 100}{D}, \quad (1)$$

where D is diameter of fungal growth (control group) and d is diameter of fungal growth (exposed to NSMs).

2.4. Evaluation of Effects on *A. thaliana* Exposed to Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺. Seeds of *A. thaliana* were disinfected using traditional techniques (sodium hypochlorite and Tween 20), incubated at 4°C for 3 days, and exposed to NSMs under several conditions: (a) exposition of seeds to NSMs under visible light for a day to analyze germination in filter paper and development in Murashige and Skoog medium (MS) [27]; (b) exposition of seeds-seedlings to NSMs in distilled water or MS liquid medium for a period of a week to analyze elongation of seedlings; (c) exposition of two-day-old seedlings to NSMs in distilled water under visible light and/or dark conditions for a day to analyze elongation of seedling after 4 days. Media were supplemented with 0, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 mg/mL of NSMs (Ag@TiO₂ or TiO₂-Cu²⁺), 0.015 mM of Ag⁰, or 1 mM of CuSO₄ (Table 1). The length of seedlings was measured with image analysis using the software Motic Images Plus 2.0.

2.5. Quantification of Chlorophyll and Anthocyanin. Total chlorophyll content was determined by using a modified method described by Nair and Chung [28], with slight modifications: seedlings treated with NSMs both, for a day and for a week, were incubated in 96% (v/v) ethanol (50 mg of tissue for 10 mL of ethanol) under dark conditions at 4°C for 3 days. The absorbance of the supernatant was measured at wavelengths of 665 (A_{665}) and 649 (A_{649}) nm using a spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis).

Total chlorophyll contents were determined by using the following formula:

$$\begin{aligned} \text{Chlorophyll a (Chla)} \\ &= (13.95) (A_{665}) - (6.88) (A_{649}), \\ \text{Chlorophyll b (Chlb)} \\ &= (24.96) (A_{649}) - (7.32) (A_{665}), \\ \text{Total chlorophyll} &= (\text{Chla} + \text{Chlb}). \end{aligned} \quad (2)$$

The anthocyanin content was determined as described by Nair and Chung [28] with slight modifications: seedlings were incubated in a 99 : 1 methanol : HCl (v/v) solution at 4 °C overnight. Supernatant was separated and light absorption was measured at 530 and 657 nm (A_{530} and A_{657}) using a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S). The relative units of anthocyanin (RUA) levels were determined with the following equation:

$$\text{RUA/g} = [A_{530} - (0.25 \times A_{657})]. \quad (3)$$

2.6. Quantification of Silver and Copper by Atomic Absorption Spectrophotometry. Seedlings were washed with either sterile distilled H₂O and/or 10 mM EDTA solution (with a pH of 6) to remove metal adhered on the plants surface; they were dried at 75 °C for 48 h, digested with concentrated HNO₃ at 115 °C for 1 h, and diluted with sterile distilled H₂O to obtain 1 mg of tissue/mL. The processed seedlings and the exposure mediums were filtered and acidified with HNO₃ and analyzed using AAS (Analyst AS-90Plus).

2.7. Statistical Analysis. Results were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test for comparison and lineal regression analysis. All data were expressed as mean \pm one standard deviation. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Characterization of Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺. The synthesis of Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺ nanostructured materials was achieved using an environmentally friendly sol-gel procedure. The amount of silver or copper into the materials was formulated to be 1% (mol/mol; Ag/Ti or Cu²⁺/Ti). Results of analysis of Ag@TiO₂ composites by SEM-EDX indicate that the TiO₂ is spherical with a mean size diameter of ~10 nm (Figure 1(a)). Silver nanoparticles show a mean diameter smaller than 10 nm; thus, it was not possible to determine their mean size by SEM analysis. EDX analysis demonstrates the existence of Ti, O, and Ag in accordance with the molar ratio of the formulation (Figure 1(b)). SEM analysis of TiO₂-Cu²⁺ also indicates a spherical shape and mean size of ~10 nm (Figure 1(c)). The presence of Ti, O, and Cu in the appropriate mole ratio was demonstrated by EDX data (Figure 1(d)). The materials were obtained as crystalline nanostructured powders after thermal annealing at 350 °C. The materials exhibit anatase crystalline structure.

The aggregation state of NSMs is a critical factor for experimentally assessing their toxic activity. It is well known that independent of the primary particle size (as solid state materials) NSMs tend to agglomerate when suspended in different media. The biological components present in the culture media and electrolytes may interact with NSMs to change their physicochemical properties (i.e., modification of surface properties) and aggregation state. The stability of these materials was evaluated using TiO₂ (Sigma-Aldrich) as control. Dynamic light scattering analysis of the materials suspended in distilled water or Physiological Saline Solution (PSS) was performed and these results indicate that the materials form bigger aggregates in saline solution than in distilled water. The hydrodynamic radio of the materials is 477 nm (TiO₂), 467 nm (Ag@TiO₂), and 360 nm (TiO₂-Cu²⁺) when suspended in distilled water. For the suspensions in PSS, the agglomerates exhibit a mean size of 774 nm (TiO₂), 776 nm (Ag@TiO₂), and 750 nm (TiO₂-Cu²⁺). Zeta potential of the suspension was also evaluated. For distilled water suspensions, the following zeta potential values were encountered: +10.39 mV (TiO₂), -27.83 mV (Ag@TiO₂), and +14.73 mV (TiO₂-Cu²⁺). In the case of PSS suspensions, the following results were encountered: +48.01 mV (TiO₂), +81.94 mV (Ag@TiO₂), and +6.85 mV (TiO₂-Cu²⁺). The studied materials present a positive surface charge when suspended in PSS. It has been reported that positively charged nanoparticles interact more strongly with biomolecules due to favored electrostatic interactions since at physiological pH value biomolecules are negatively charged, thus facilitating interaction of NSMs and biomolecules.

3.2. Antimicrobial Activity of Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺ in *E. coli* and *S. cerevisiae*. Two sets of inactivation kinetics assays (under visible light and in the dark) were conducted to evaluate the *E. coli* inactivation rate (Figures 2(a) and 2(b)). The results obtained indicate that Ag@TiO₂ exerted strong bacterial inactivation (3 U log) in a short time period (2 h with 10 mg/mL of NSMs). It was also observed that lower amounts of NSMs exhibit longer inhibition times: 2.2 U log with 0.5 mg/mL at 4 h and 2.9 U log with 1 mg/mL at 4 h (Figure 2(a)). There are no significant differences for inactivation rate and extent of inactivation when assays are performed under radiation or in the dark (Figures 2(a) and 2(b)), which indicates that the principal mechanism for inactivation is the release of Ag⁺ ions from Ag@TiO₂ materials [8, 29]. There is no inactivation of *E. coli* growth as a consequence of exposure to visible light radiation. Colloidal silver inhibited bacteria growth with 6 U log at 2 h (Figures 2(a) and 2(b)). Although the inactivation rate of colloidal silver is higher than the one observed for Ag@TiO₂ composites, both materials exerted efficient bactericidal effect.

In general, *S. cerevisiae* was more resistant than *E. coli* to colloidal silver and Ag@TiO₂ NSMs microbicidal activity (Figures 2(c) and 2(d)). Longer exposure times at high concentrations of NSMs were necessary to achieve a good inhibition of *S. cerevisiae* growth, with a maximum inactivation of 2.6 U log with 10 mg/mL under visible light after 24 h (Figure 2(c)). The tolerance observed by yeast to the

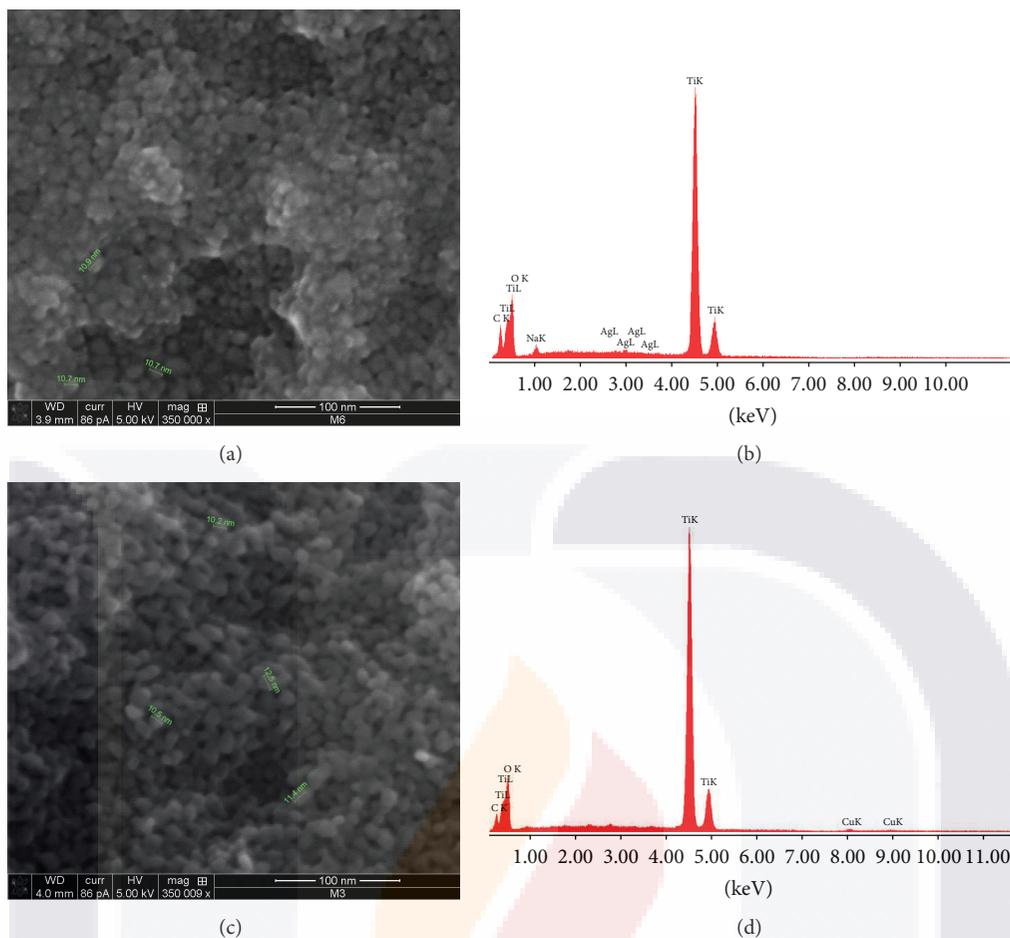


FIGURE 1: Characterization of NSMs. (a) SEM image of Ag@TiO₂. (b) Elemental composition of Ag@TiO₂ (EDX). (c) SEM image of TiO₂-Cu²⁺. (d) Elemental composition of TiO₂-Cu²⁺ (EDX).

microbicidal activity of Ag NSMs is due to the more complex structure (the presence of a cell wall, composed of beta-glucans, chitin, and mannoproteins, limits the passage of Ag⁺ ion) of these microorganisms [30]. When the variable under study was light radiation, slight differences were observed for the inhibition of *S. cerevisiae* with Ag@TiO₂, with 1.9 U log with 10 mg/mL, in dark after 24 h (Figure 2(d)). For *E. coli*, an inhibition growth mechanism based on Ag⁺ activity was suggested since no enhancement in the rate or extent of inactivation was observed when the assay was conducted under visible light radiation. In accordance with several previously published reports, metal doped TiO₂ NSMs, when activated with visible light, generate reactive oxygen species (ROS) that are associated with cell damage in microorganisms [7, 31]. For the growth inhibition of *S. cerevisiae*, the effect of ROS is more significant since the components of the cell wall can be susceptible to oxidation.

The TiO₂-Cu²⁺ antimicrobial activity was evaluated under the same conditions reported for Ag@TiO₂ materials. Regarding high *E. coli* densities (10⁶ CFU/mL), TiO₂-Cu²⁺ NSMs did not show bactericidal activity even at the highest concentration (10 mg/mL) (Figure 2(e)). As observed for silver based materials, the activity of TiO₂-Cu²⁺ against *E.*

coli depends on the amount of metal ions liberated into solution; however, since the microbicidal activity of silver is higher in comparison to copper, larger amounts of Cu²⁺ must be released to achieve bacterial inactivation [8, 12]. By comparing the effect of colloidal silver and copper sulfate solution, inactivation rate and extent of inactivation are lower for copper sulfate, corroborating that higher concentrations of this ion are required to achieve inactivation of elevated microbial densities (10⁶ CFU/mL). Nonradiated samples did not show inhibitory effect.

In the evaluation of the growth inhibition for *S. cerevisiae* using TiO₂-Cu²⁺ materials, results indicate similar behavior to Ag@TiO₂; the viability of *S. cerevisiae* diminished as a function of material concentration, time of exposure, and visible light radiation. The maximum inactivation was of 1.9 U log with 10 mg/mL after 24 h (Figure 2(f)).

It has been postulated that the microbicidal activity of Ag@TiO₂ is proportional to the amount of silver ions released into the medium [8, 29]. To correlate the activity of the NSMs under investigation to their liberation of metal ions into solution, supernatants of the exposition medium were analyzed by AAS. Reported results indicate the presence of silver at a concentration of 0.16 ppm in the exposure medium

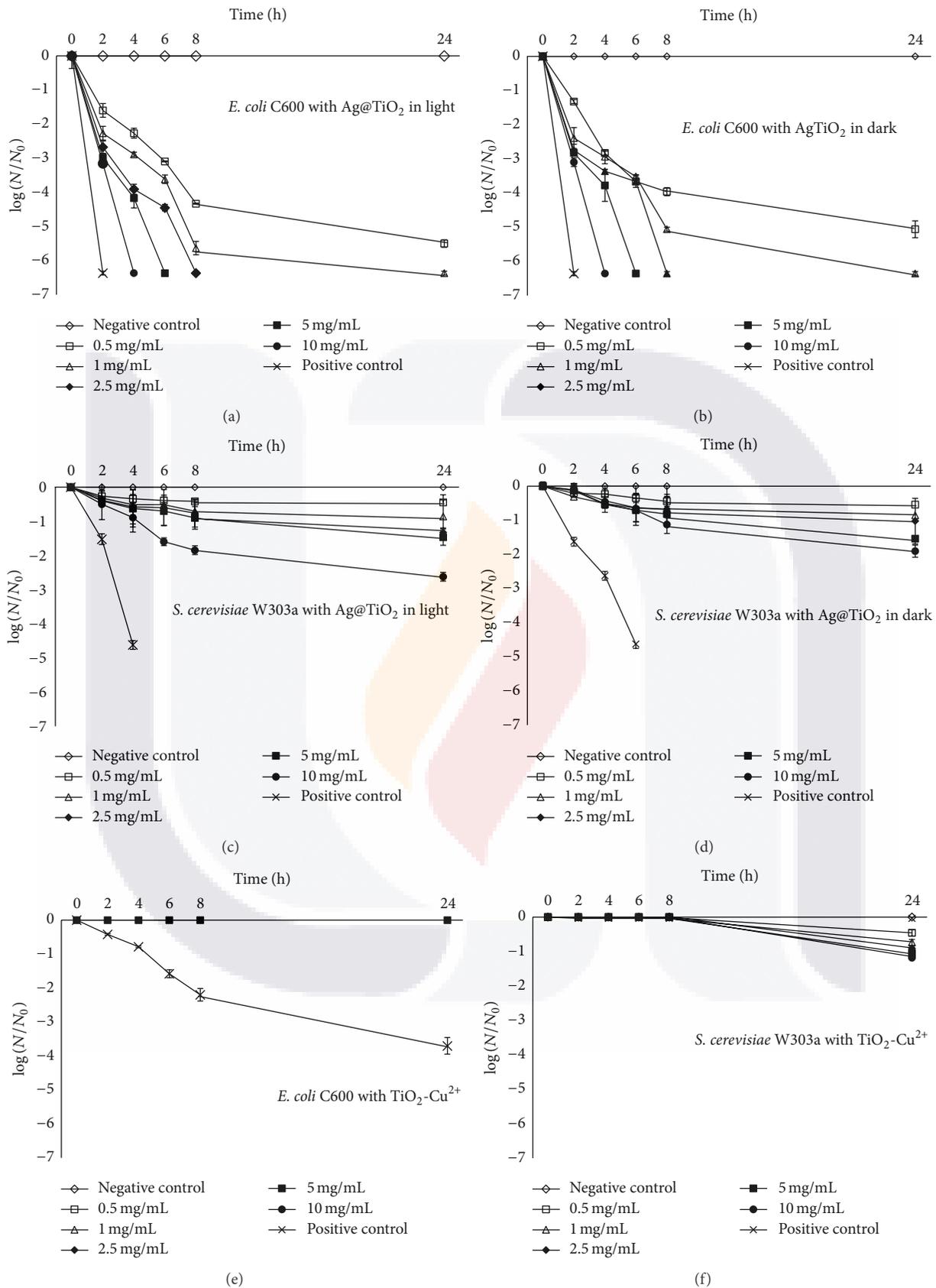


FIGURE 2: Inactivation of microorganisms by NSMs: *E. coli* with Ag@TiO₂ (a) under visible light and (b) in dark; *S. cerevisiae* with Ag@TiO₂ (c) under visible light and (d) in dark; (e) *E. coli* with TiO₂-Cu²⁺; (f) *S. cerevisiae* with TiO₂-Cu²⁺. As positive control, Ag⁰ for Ag@TiO₂ and CuSO₄ for TiO₂-Cu²⁺. Bars represent standard deviation; each treatment was performed in triplicate.

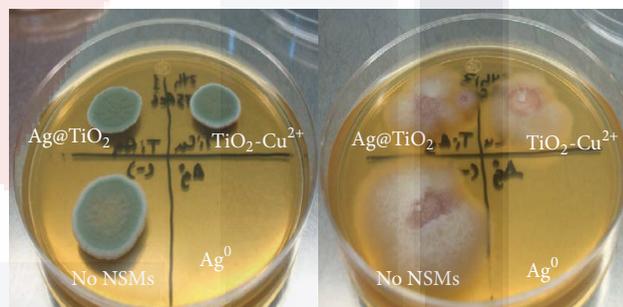
TABLE 2: Determination of copper and silver by atomic absorption spectrophotometry.

NSMs	Seedling treated in MS for a week ^a		Seedling treated in H ₂ O for 24 h ^a	
	(Ag) mg/g	(Cu) mg/g	(Ag) mg/g	(Cu) mg/g
Ag@TiO ₂	0.58 ± 0.03	—	0.23 ± 0.23	—
TiO ₂ -Cu ²⁺	—	0.29 ± 0.06	—	0.31 ± 0.03
Ag ⁰	0.2 ± 0.05	—	0.12 ± 0.01	—
Control (-)	0	0.12 ± 0.016	0	0.13 ± 0.01
NSMs	MS medium after a week ^b		H ₂ O after a week ^b	
	(Ag) ppm	(Cu) ppm	(Ag) ppm	(Cu) ppm
Ag@TiO ₂	0.17 ± 0.01	—	0	—
TiO ₂ -Cu ²⁺	—	3.17 ± 0.148	—	0.08 ± 0.02
Ag ⁰	0.085 ± 0.03	—	0.47 ± 0.01	—
Control (-)	0	0.11 ± 0.05	0	0.04 ± 0.002
NSMs	H ₂ O after 24 h ^b		Phosphate buffer pH 5.7 after 24 h ^b	
	(Ag) ppm	(Cu) ppm	(Ag) ppm	(Cu) ppm
Ag@TiO ₂	0.06 ± 0.003	—	0.1 ± 0.01	—
TiO ₂ -Cu ²⁺	—	0.25 ± 0.03	—	0.47 ± 0.07
Ag ⁰	0.63 ± 0.02	—	0.25 ± 0.02	—
Control (-)	0	0.11 ± 0.05	0	0.03 ± 0.001
NSMs	Phosphate buffer pH 7 after 24 h ^c			
	(Ag) ppm	(Cu) ppm		
Ag@TiO ₂	0.16 ± 0.02	—		
TiO ₂ -Cu ²⁺	—	0.5 ± 0.01		
Ag ⁰	0.2 ± 0.04	—		
Control (-)	0	0.1 ± 0.03		

^aSeedling treated, ^bexposure medium of seedlings, and ^cexposure medium of microorganisms with 1 mg/mL of Ag@TiO₂, 1 mg/mL of TiO₂-Cu²⁺, and 0.015 mM Ag⁰.

Treatment	Hypochlorite Tween 20	Ag@TiO ₂	TiO ₂ -Cu ²⁺	H ₂ O
Disinfection (% ± SD)	100 ± 0	72 ± 12	36 ± 8	41 ± 11
<i>A. thaliana</i> seeds in MS				

(a)



(b)

FIGURE 3: Seeds and their contaminants treated with Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺. (a) Treatment of *A. thaliana* seeds with 10 mg/mL of NSMs prior to cultivation *in vitro*; (b) fungal contaminants seeds exposed to 10 mg/mL of NSMs; each treatment was performed in triplicate.

(phosphate buffer pH 7; Table 2). Copper was also found in the exposition medium (Table 2) at very low concentration (0.5 ppm). Although the amount of Cu²⁺ released into the medium is higher in comparison to released Ag⁺, better performance of silver based materials is achieved due to enhanced microbicidal activity of Ag⁺.

3.3. Activity of Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺ in Seed Disinfection. Several experiments were conducted to assess Ag@TiO₂ and TiO₂-Cu²⁺ use as disinfectants for axenic conditions. *A.*

thaliana seeds were treated with 10 mg/mL of NSMs for 24 h and then cultured in MS agar medium. Results are summarized in Figure 3(a) and indicate that total seed disinfection was not observed with this treatment. Although inhibition of microbial growth was observed for the samples treated with NSMs, the activity of the materials is insufficient for *in vitro* culture of seeds (Ag@TiO₂: 72% inhibition; TiO₂-Cu²⁺: 36% inhibition; control: 41% inhibition). It is important to remark that the materials show good microbicidal activity when they are evaluated using a single microorganisms species (i.e., *E.*

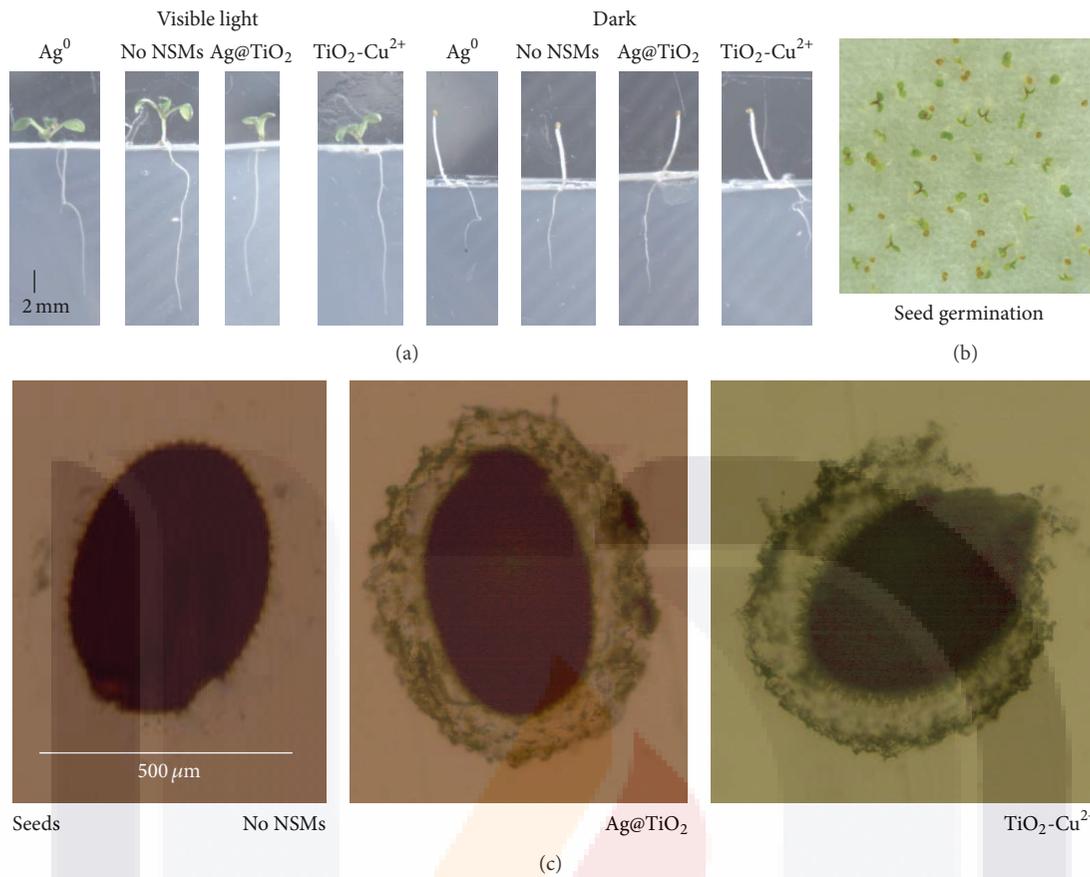


FIGURE 4: Seeds of *A. thaliana* exposed to $Ag@TiO_2$ and TiO_2-Cu^{2+} . (a) Seedlings grown in MS agar medium, $n = 10$; (b) germinated seeds, $n = 90$; (c) NSMs adhered on seeds.

coli or *S. cerevisiae*); however, when the materials are exposed to microorganisms consortiums, the activity of the materials seems to be diminished.

In a different experiment, two fungi species (*Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp.) isolated from *A. thaliana* seeds (without disinfection) cultivated were treated with 10 mg/mL of $Ag@TiO_2$ and 10 mg/mL of TiO_2-Cu^{2+} under visible light for 24 h. After that, 10 μL was inoculated and incubated in PD agar. Results indicate radial inhibition of fungal growth in the groups treated with NSMs (Figure 3(b)). The inhibition was calculated measuring diameters of colonies and expressed as radial inhibition percentage (RI%). In the case of *Aspergillus* spp., RI% was as follows: 35% ($Ag@TiO_2$) and 45% (TiO_2-Cu^{2+}). For *Fusarium* spp., the values encountered for RI% were as follows: 17% ($Ag@TiO_2$) and 34% (TiO_2-Cu^{2+}). We observed that copper doped materials show better antimicrobial activity against the fungal species under study, with *Aspergillus* spp. being more sensible to the treatment. Kim and coworkers [26] reported the activity of silver NSMs against several plant pathogenic fungi; an RI% of 100% was observed which is ascribed to metal toxicity. It is important to remark that, in the last decade, caution has been suggested regarding the industrial application of nanosilver formulations, since USEPA (2008) has classified all products containing nanostructured silver as pesticides

and also recommended the analysis of their potential risks to human and environmental health [3]. Although the efficiency of these materials is lower regarding growth inhibition of fungi, as previously mentioned, it is worth remarking that these materials are doped with very low amounts of the metal impurity (1 mol%). Thus, it is predicted that TiO_2-Cu^{2+} or $Ag@TiO_2$ at higher dopant concentration should be considered as potential candidates for the treatment of plant pathogenic microorganisms.

3.4. Effects on *A. thaliana* by Exposure to $Ag@TiO_2$ and TiO_2-Cu^{2+} . This work aims to elucidate the impact that metal doped NSMs might pose on plants. *A. thaliana* seeds or seedlings were exposed to metal doped NSMs ($Ag@TiO_2$ or TiO_2-Cu^{2+}). After interaction with NSMs, evaluation of plant growth and development of *A. thaliana* was investigated. Different sets of experiments were conducted to achieve this goal. First, seeds were exposed for 24 h to different NSMs or metal ions ($Ag@TiO_2$, TiO_2-Cu^{2+} , Ag^0 , and Cu^{2+}) using different media (distilled water or potassium phosphate buffer pH 5.7). Germination and development of seeds was evaluated. The interaction of NSMs with seeds of *A. thaliana* does not affect germination (100%) or their development (Figures 4(a) and 4(b)). A more detailed microscopic analysis of the seeds indicates that $Ag@TiO_2$ and TiO_2-Cu^{2+} are

adhered to the seed surface (Figure 4(c)). However, this physical interaction did not interrupt the flow of water inside the seed. Also, it can be inferred that the seed coat acts like a membrane with selective permeability, which protects the embryo from dangerous substances (present in the surrounding medium), preventing the entry of these materials; for that reason, the germination or development of seedlings was not affected. Germination of *A. thaliana* seeds was not affected by the exposition media (distilled water or potassium phosphate buffer pH 5.7) used for evaluation of interaction of NSMs with plants.

Nanosilver formulations and copper salts are currently being used as insecticides or fungicides for plant protection applications. However, the risk assessment of these formulations has been poorly investigated [12]. In this work, the activity of colloidal silver and Cu^{2+} ions was evaluated since these metals are used as dopants and lately they have been associated with deleterious effects or bioaccumulation in plants [3]. Thus, seeds of *A. thaliana* were exposed to commercial formulation of colloidal silver (0.015 mM Ag^0) or to a solution of CuSO_4 1 mM. The interaction of *A. thaliana* with colloidal silver did not affect the germination of seeds and/or the growth of the seedlings. Metal ions are associated with the toxic effects exerted by metallic nanoparticles (MNPs), since MNPs are insoluble in water and also have a tendency to agglomerate in this medium, which limits the flow of these materials into the plant. However, MNPs are reactive and prone to oxidation, giving rise to the liberation of metal ions into solution. In this study, the concentration of free Ag^+ ions was not sufficient to induce changes in germination and/or growth of *A. thaliana* (Figures 4(a) and 4(b)). On the other hand, the seeds exposed to 1 mM CuSO_4 solution exhibited a total inhibition of germination. The AAS results showed that although exposure medium contains metal ions (Table 2) dissociated from NSMs, H_2O (silver 0.06 ± 0.003 mg/L; copper 0.24 ± 0.03 mg/L), and phosphate buffer pH 5.7 (silver 0.1 ± 0.008 mg/L; copper 0.47 ± 0.067 mg/L), such amount of metal ions did not produce toxicity in *A. thaliana* seeds. Meanwhile, seeds exposed to 0.015 mM Ag^0 had normal germination and growth (Figures 4(a) and 4(b)), although silver found in the exposure medium with Ag^0 was ten times more concentrated (0.6 ± 0.02 mg/L) than exposure medium with Ag@TiO_2 (Table 2). The results reported in this work agree with previous reports that describe inhibition of germination due to the exposure of seeds to high concentrations of Cu^{2+} . For instance, Ivanova and coworkers [32] found that the germination of *Brassica napus* L. can be inhibited in the presence of CuSO_4 0.3 mM. Later, Sathy and Ghosh [33] suggested that copper prevents water ingress to the seed and affects sucrose metabolism, inhibiting germination.

There are more reports on the evaluation of acute toxicity than on the evaluation of chronic toxicity of NSMs towards diverse living organisms. In this work, we evaluated the effect of time of exposure of plants to NSMs. Seeds of *A. thaliana* were exposed to NSMs for a time period of a week; in general, seedlings exhibited growth inhibition as a result of interaction with NSMs; also, differences were encountered

regarding growth inhibition, depending on the exposition medium (distilled water or MS) of *A. thaliana* to NSMs. Results are schematically represented in Figures 5 and 6. Growth inhibition of the treated seedlings is easily observed when compared to control group. Significant differences (with respect to control group) are observed at NSMs concentrations equal to or higher than 2.5 mg/mL, independent of the chemical composition of the material (Ag@TiO_2 or $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$) when the exposition medium is MS (Figures 5(a), 5(b), 6(a), and 6(b)). If exposure medium is distilled water, growth inhibition is dependent on the chemical composition of the material; for instance, $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ exert toxic effect at lower concentration (0.5 mg/mL) than Ag@TiO_2 (2.5 mg/mL) (Figures 5(c), 5(d), 6(a), and 6(b)). To justify the differences in the toxicity exerted for NSMs under study, AAS was employed to determine the translocation of silver and/or copper into the seedlings. Results are summarized in Table 2. When seedlings were exposed to NSMs for a period of a week using MS as exposure medium, it was observed that seedlings exposed to Ag@TiO_2 accumulate higher amount of silver (0.58 mg/g of tissue) in comparison to control group (0 mg/g of tissue) or the group exposed to colloidal silver (0.2 mg/g of tissue). Although the total amount of silver in the colloidal solution is higher than the one encountered in Ag@TiO_2 NSMs, it is likely that the particle size of colloidal solution is bigger; also, particles might agglomerate or precipitate from the medium, reducing the bioavailability of the metal. In the case of Ag@TiO_2 materials, silver nanoparticles are very small but are supported on the TiO_2 matrix; thus, the leaching of Ag^+ ions is controlled, resulting in a higher bioavailability. From Figure 6(a), we can see that seedlings exposed to Ag@TiO_2 (2.5 mg of NSMs/mL) showed an elongation of 0.45 cm versus the elongation observed for the seedlings exposed to colloidal silver which was encountered to be 0.61 cm. From here we can see that toxicity (growth inhibition) of NSMs is directly related to the amount of free Ag^+ ions, in accordance with results published in literature [34].

As previously discussed, copper is an essential element in plants but the redox properties of this element also contribute to its inherent toxicity. The amount of copper in seedlings exposed to 1 mg/mL of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ for a week in MS was determined by AAS, and it was found to be 0.29 mg/g of tissue, while the average content of Cu in plant tissue has been reported as 6 $\mu\text{g/g}$ dry weight (Table 2) [35]. Leaching of copper ions from the material was also determined by means of AAS, after interaction with biological samples. It was observed that the amount of residual Cu^{2+} is higher in MS medium than the amount of Cu^{2+} encountered in distilled water. On the contrary, biological samples exposed to NSMs in MS medium contain less amount of copper than samples exposed to NSMs using distilled water. The bioavailability of Cu^{2+} ion in the presence of EDTA contained in MS medium is reduced due to the formation of metal complexes. EDTA is added to MS medium in order to form $\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA}$ complexes ($\log K_f = 14.3$) and avoid iron precipitation [36]. Since EDTA is a good metal chelator, it can also form complexes with Cu^{2+} ($\log K_f = 18.8$); thus, as Cu^{2+} ion leaches from $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ material, it is complexed and thereby

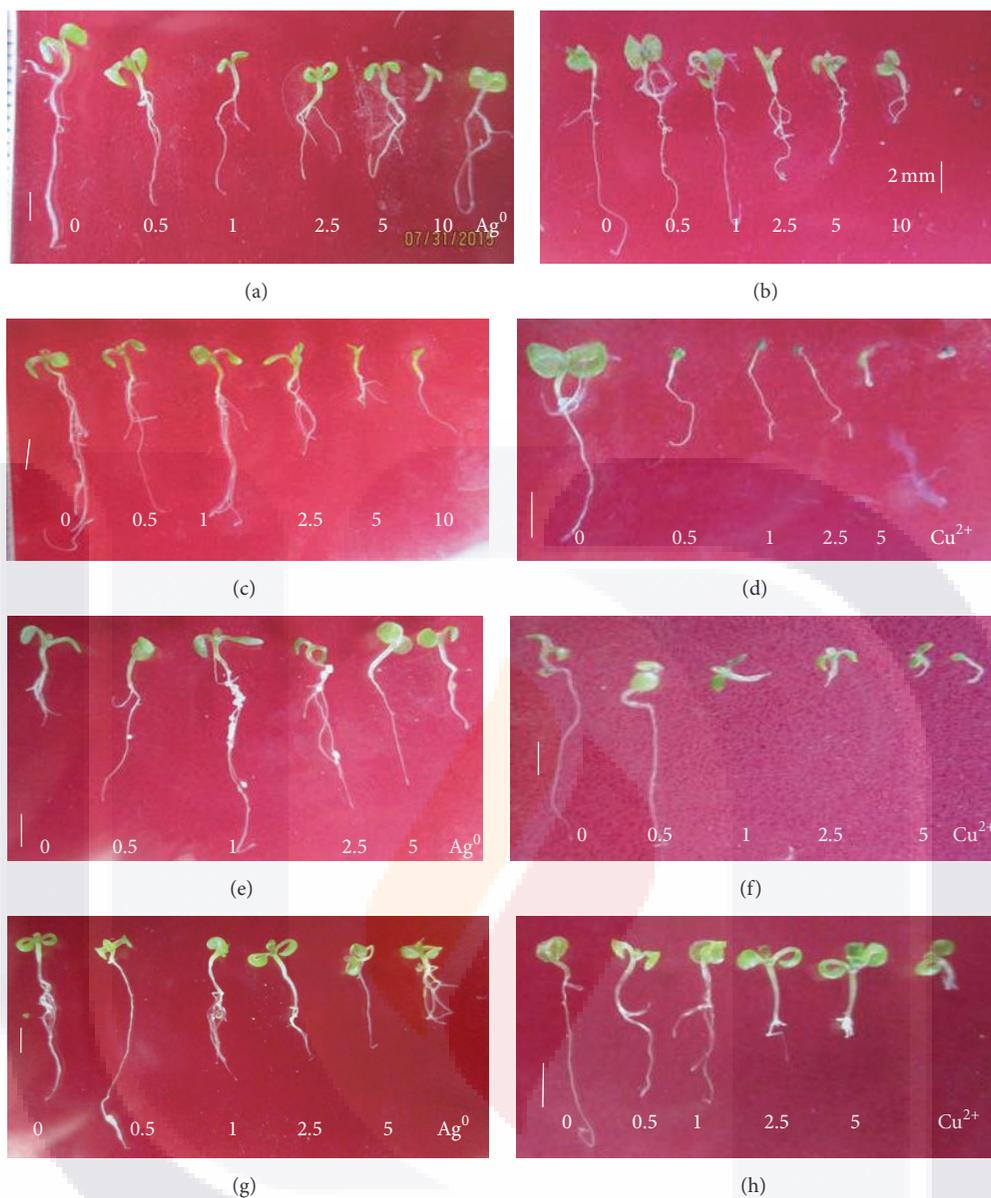


FIGURE 5: Seedlings of *A. thaliana* exposed to NSMs. (a) Ag@TiO₂ and (b) TiO₂-Cu²⁺ in MS broth medium for a week; (c) Ag@TiO₂ and (d) TiO₂-Cu²⁺ in H₂O for a week; (e) Ag@TiO₂ and (f) TiO₂-Cu²⁺ in H₂O, radiated for 24 h; (g) Ag@TiO₂ and (h) TiO₂-Cu²⁺ in H₂O, nonradiated for 24 h. Numbers indicate NSMs concentrations (0, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 mg/mL).

its bioavailability reduced. In summary, for seedlings exposed to NSMs using water as medium for exposition, the amount of copper translocated into the plant was higher than the one encountered for seedlings exposed in MS medium (Table 2). Also, the toxicity of Cu²⁺ ions (growth inhibition) is clearly observed when plants are exposed using distilled water as exposure medium (Figure 6(b)).

In a different experiment, two-day-old seedlings were exposed to NSMs suspended in distilled water (Treatment 3, Table 1) for a day. Results are summarized and schematically represented in Figures 5(e), 5(f), 5(g), 5(h), and 6. Dose-response experiments indicate that the interaction of *A. thaliana* seedlings with Ag@TiO₂ favors seedling growth at

concentrations ≤ 2.5 mg/mL under visible light for a period of 24 h (Figures 5(e) and 6(a)). Treated seedlings under these conditions showed larger growth (with a length of 2 ± 0.5 cm) than seedlings without interaction with NSMs (with a length of 1.3 ± 0.3 cm) (Figures 5(e) and 6(a)). Beneficial effects due to the interaction of plants with silver NSMs and/or TiO₂ materials have been previously reported. For instance, Shams and coworkers [37] reported an improvement in the development of cucumber due to its interaction with Ag NSMs. Silver doped titanium dioxide can be activated under visible light radiation generating e⁻/h⁺ reactive species that interact with molecular oxygen and/or water to produce reactive oxygen species (ROS), particularly the hydroxyl

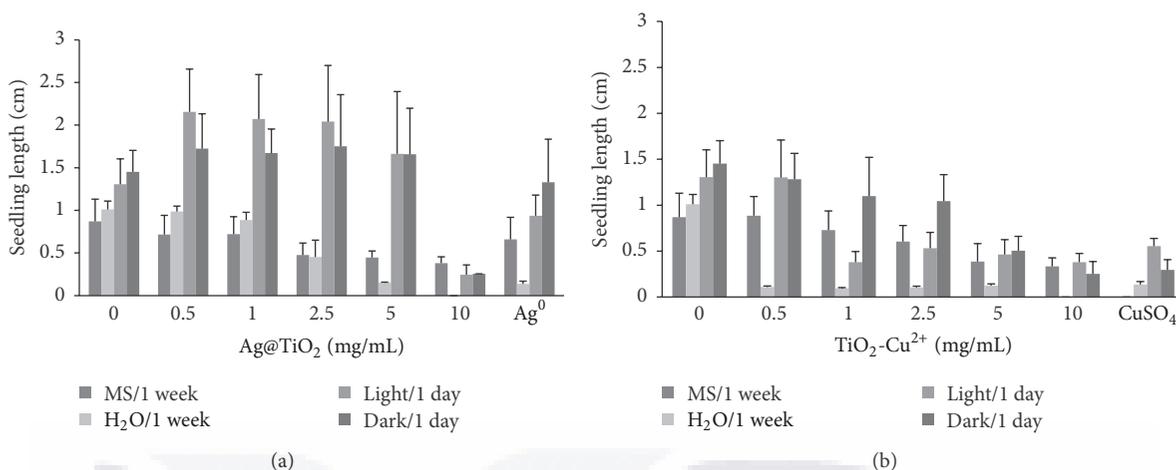


FIGURE 6: Seedlings elongation after exposure to NSMs: (a) Ag@TiO₂ and (b) TiO₂-Cu²⁺. Columns represent the mean and the bars represent ± one standard deviation; $n = 10$.

radical (HO·), a very strong oxidizing agent that has been associated with participating in the loosening of the plant cell wall, resulting in root elongation [38]. On the other hand, deleterious effects due to the interaction of Ag NSMs with plants have been reported. For instance, Wang and coworkers [34] reported stimulatory effect on root elongation, fresh weight, and evapotranspiration of poplars and *A. thaliana* when exposed to low concentrations of Ag NSMs, whereas Ag NSMs were phytotoxic above specific concentrations. Phytostimulation (seedling elongation) of *A. thaliana* due to the interaction with Ag@TiO₂ at low concentrations (0.5, 1, and 2.5 mg/mL) was observed. However, at higher concentrations (≥ 5 mg/mL) stimulatory effect was not observed (Figures 5(e) and 6(a)). The synergistic activity of the composite material was demonstrated, since there are no significant differences in elongation (in comparison to control group) of *A. thaliana* when exposed to Ag@TiO₂ without radiation (Figures 5(g) and 6(a)).

In a related experiment, two-day-old seedlings exposed to TiO₂-Cu²⁺ for 24 h (Treatment 3, Table 1) were measured 4 days after exposure. Seedlings exposed to NSMs showed lower elongation than control group seedlings (Figures 5(f), 5(h), and 6(b)). The difference of elongation was significant at concentrations higher than 0.5 mg/mL under visible light and 5 mg/mL in the dark (Figure 6(b)). Those results showed that visible light potentiates TiO₂-Cu²⁺ effect on *A. thaliana*, probably because plant stress is higher in those conditions. This result may be due to the photocatalytic activity of the material that generates ROS which are responsible for oxidative stress in diverse living organisms. Also, liberation of Cu²⁺ ions into solution is favored as a result of the photoactivation of the catalyst [39]. Previous reports associate stress with a greater production of ethylene, which limits root elongation [35]. Seedlings treated with CuSO₄ showed less elongation too (Figures 5(f), 5(h), and 6(b)); that effect has been known for some time; although copper has important functions (e.g., cofactor of cytochrome oxidase enzyme), copper rapidly becomes toxic in liquid plant cultures [35].

Copper has affinity for sulfhydryl groups in membranes which induce lipoperoxidation, producing damage in cell membrane or free radicals, and lower permeability of root cells [40]. To determine the amount of leached copper, exposure media and plants exposed to TiO₂-Cu²⁺ were analyzed by atomic absorption spectrometry. Copper was found in water medium exposed for 24 h to TiO₂-Cu²⁺ (0.2 ± 0.03 mg/L); in water medium without NSMs, the amount of copper was 0.1 ± 0.05 mg/L (Table 2), which indicates that copper was dissociated from NSMs. Copper content in seedlings was higher in those exposed to TiO₂-Cu²⁺ (0.3 ± 0.03 mg/g of tissue) than in those that were not exposed (0.1 ± 0.01 mg/g) (Table 2), which suggests that copper participates in the observed deleterious effects (Figures 5(f) and 5(h)).

3.5. Total Chlorophyll and Anthocyanin Content. Total chlorophyll content was measured to analyze the effect of NSMs on the production of photosynthetic pigment in seedlings of *A. thaliana*. Seedlings exposed to 1 mg/mL of NSMs in MS for a week showed increased production of chlorophyll; the values were 1.8 ± 0.3 mg/g of tissue for Ag@TiO₂, 1.6 ± 0.08 mg/g for TiO₂-Cu²⁺, and 1 ± 0.2 mg/g for negative control (seedlings that were not exposed to NSMs) (Figure 7(a)). However, seedlings exposed to 2.5 mg/mL of NSMs for a week suffer a reduction to 0.3 ± 0.02 mg/g of total chlorophyll for both NSMs (Figures 7(a) and 7(b)). Regarding positive controls, the chlorophyll content of seedlings exposed for a week to Ag⁰ was 0.7 ± 0.15 mg/g and CuSO₄ 0.01 ± 0.001 mg/g. In another experiment, seedlings exposed for 24 h did not show significant differences in the total chlorophyll content of the seedlings in some conditions: (a) 1 mg/mL of Ag@TiO₂ (1.4 ± 0.36 mg/g), (b) 1 mg/mL of TiO₂-Cu²⁺ (1.4 ± 0.37 mg/g), (c) Ag⁰ (1.3 ± 0.24 mg/g), and (d) negative control without NSMs (1.2 ± 0.35 mg/g) (Figures 7(a) and 7(b)). However, in different conditions the total chlorophyll content was lower than in negative control, for example, in seedlings exposed to 5 mg/mL of Ag@TiO₂ (0.5 ± 0.07 mg/g

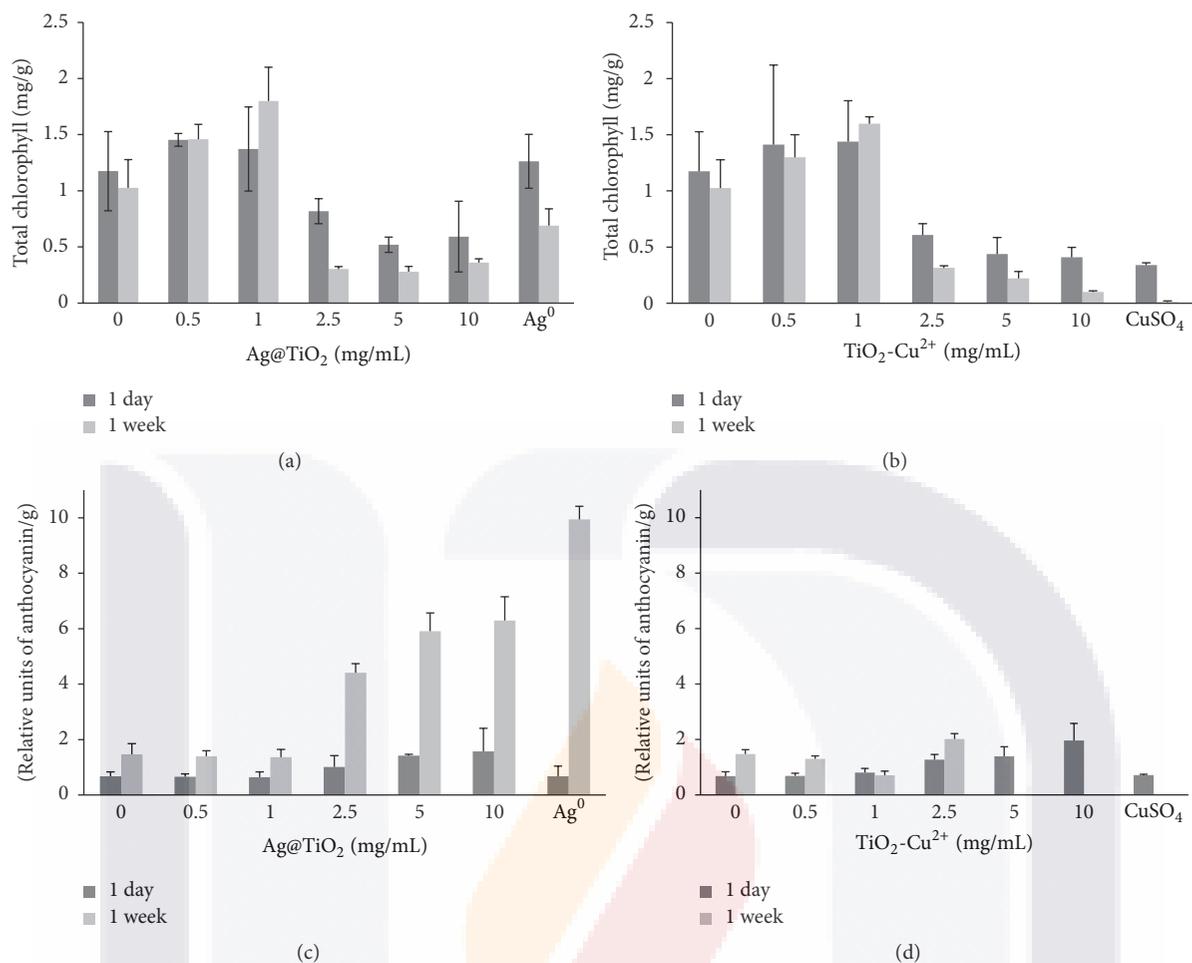


FIGURE 7: Total chlorophyll and anthocyanin content. Total chlorophyll content (mg/g of tissue) in seedling exposed to (a) Ag@TiO₂ and (b) TiO₂-Cu²⁺; anthocyanin content (relative units of anthocyanin (RUA)/g of tissue) in seedlings exposed to (c) Ag@TiO₂ and (d) TiO₂-Cu²⁺; columns represent the mean and the bars represent ± one standard deviation; $n = 3$.

of tissue), 5 mg/mL of TiO₂-Cu²⁺ (0.4 ± 0.14 mg/g of tissue), and CuSO₄ (0.3 ± 0.02 mg/g of tissue) (Figures 7(a) and 7(b)).

There are some reports that indicate an increase in the amount of chlorophyll in plants upon exposition to TiO₂ NSMs; for instance, Morteza and coworkers [41] suggested that exposition of *Zea mays* L., in reproductive stage, to TiO₂ NSMs contributes to stabilizing the integrity of the chloroplast membrane, protecting chlorophyll. Although other studies report a decrease of chlorophyll content, for example, Nair and Chung suggest that seedlings of *Oryza sativa* L. exposed to silver NSMs [28] and seedlings of *Brassica juncea* L. exposed to copper oxide NSMs [42] showed a reduction of total chlorophyll content due to damage caused to chloroplast membranes as a result of lipid peroxidation by oxidative stress produced by the excess of metal or as result of depletion of iron (Fe) by copper or due to reduced biomass.

To examine the impact of NSM in *A. thaliana*, the anthocyanin content was measured. Anthocyanins are flavonoids that are responsible for coloration in flowers and fruits of higher plants. They are pigments with protective functions against UV radiation; ROS, microorganisms, and the total

amount of anthocyanin in plants can change due to some type of stress [43]. Seedling exposed to lower concentrations of NSMs in MS for a week does not show significant differences into the anthocyanin with respect to control group without NSMs (1.4 ± 0.4 relative units of anthocyanin per gram of tissue (RUA/g)), for example, (a) 0.5 mg/mL of TiO₂-Cu²⁺ (1.3 ± 0.1 RUA/g) and (b) 1 mg/mL of Ag@TiO₂ (1.3 ± 0.3 RUA/g) (Figures 7(c) and 7(d)); but the anthocyanin content was increased in seedling exposed to 2.5 mg/mL and higher concentration of Ag@TiO₂ (4.4 ± 0.3 RUA/g). The anthocyanin content in seedlings exposed for 24 h was significantly higher with respect to negative control (0.67 ± 0.14 RUA/g) in some conditions, for example, in seedlings exposed to 5 mg/mL of Ag@TiO₂ (1.4 ± 0.05 RUA/g) and 2.5 mg/mL of TiO₂-Cu²⁺ (1.2 ± 0.2 RUA/g) (Figures 7(c) and 7(d)). Syu and coworkers [44] suggest that the increase of anthocyanin content in *A. thaliana* is due to oxidative stress produced by exposition to Ag NSM and NSMs studied in the present work produce ROS and metal (Ag and Cu) is leached by the materials, which could cause oxidative stress stimulating the anthocyanin production.

4. Conclusions

The synthesis of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ and Ag@TiO_2 was achieved using an environmentally friendly sol-gel procedure. The nanometric nature, crystallinity, and purity of the materials were demonstrated. Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ showed antimicrobial activity against *E. coli* and *S. cerevisiae*, due to either the photocatalytic property or the metals toxicity. Ag@TiO_2 was more active than $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, while *E. coli* was more sensitive to Ag@TiO_2 than *S. cerevisiae*. These NSMs showed moderate inhibitory activity against filamentous fungi. The interaction of Ag@TiO_2 with *A. thaliana* showed the following: (a) germination was not affected; (b) seedlings exposed to low concentrations and under light for 24 h had higher elongation; (c) seedling exposed for a week grew less; and (d) total chlorophyll content decreased and anthocyanin increased in seedlings exposed at high concentrations for a week, while seedlings exposed to $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ showed the following: (a) no effect on germination; (b) lower elongation, depending on concentration; and (c) lower total chlorophyll content in seedlings exposed at higher concentrations.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- [1] H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, and J. Zhao, "Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 10, article 15, 2013.
- [2] U. Song, H. Jun, B. Waldman et al., "Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO_2 and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*)," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 93, pp. 60–67, 2013.
- [3] N. A. Anjum, S. S. Gill, A. C. Duarte, E. Pereira, and I. Ahmad, "Silver nanoparticles in soil-plant systems," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 15, article 1896, 2013.
- [4] J. Thiel, L. Pakstis, S. Buzby et al., "Antibacterial properties of silver-doped titania," *Small*, vol. 3, no. 5, pp. 799–803, 2007.
- [5] A. N. Banerjee, "The design, fabrication, and photocatalytic utility of nanostructured semiconductors: focus on TiO_2 -based nanostructures," *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 4, no. 1, pp. 35–65, 2011.
- [6] P. D. Cozzoli, R. Comparelli, E. Fanizza, M. L. Curri, A. Agostiano, and D. Laub, "Photocatalytic synthesis of silver nanoparticles stabilized by TiO_2 nanorods: a semiconductor/metal nanocomposite in homogeneous nonpolar solution," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 12, pp. 3868–3879, 2004.
- [7] M. B. Wilker, K. J. Schnitzenbaumer, and G. Dukovic, "Recent progress in photocatalysis mediated by colloidal II-VI nanocrystals," *Israel Journal of Chemistry*, vol. 52, no. 11-12, pp. 1002–1015, 2012.
- [8] X. H. Yang, H. T. Fu, X. C. Wang, J. L. Yang, X. C. Jiang, and A. B. Yu, "Synthesis of silver-titanium dioxide nanocomposites for antimicrobial applications," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 16, article 2526, 2014.
- [9] Y. Paz, "Application of TiO_2 photocatalysis for air treatment: Patents' overview," *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 99, no. 3-4, pp. 448–460, 2010.
- [10] M. V. Liga, E. L. Bryant, V. L. Colvin, and Q. Li, "Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment," *Water Research*, vol. 45, no. 2, pp. 535–544, 2011.
- [11] L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, and Z. Wu, "Antibacterial coatings on titanium implants," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 91, no. 1, pp. 470–480, 2009.
- [12] A. Gogos, K. Knauer, and T. D. Bucheli, "Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 39, pp. 9781–9792, 2012.
- [13] S. G. Royce, D. Mukherjee, T. Cai et al., "Modeling population exposures to silver nanoparticles present in consumer products," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 16, no. 11, pp. 2724–2749, 2014.
- [14] P. Miralles, E. Johnson, T. L. Church, and A. T. Harris, "Multi-walled carbon nanotubes in alfalfa and wheat: toxicology and uptake," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 9, no. 77, pp. 3514–3527, 2012.
- [15] M. B. Fisher, D. A. Keane, P. Fernández-Ibáñez et al., "Nitrogen and copper doped solar light active TiO_2 photocatalysts for water decontamination," *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 130-131, pp. 8–13, 2013.
- [16] T.-D. Pham and B.-K. Lee, "Cu doped TiO_2/GF for photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* in bioaerosols under visible light irradiation: application and mechanism," *Applied Surface Science*, vol. 296, pp. 15–23, 2014.
- [17] H. M. Yadav, S. V. Otari, V. B. Koli et al., "Preparation and characterization of copper-doped anatase TiO_2 nanoparticles with visible light photocatalytic antibacterial activity," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 280, pp. 32–38, 2014.
- [18] X. Pan, I. Medina-Ramirez, R. Mernaugh, and J. Liu, "Nano-characterization and bactericidal performance of silver modified titania photocatalyst," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 77, no. 1, pp. 82–89, 2010.
- [19] I. Medina-Ramirez, Z. Luo, S. Bashir, R. Mernaugh, and J. L. Liu, "Facile design and nanostructural evaluation of silver-modified titania used as disinfectant," *Dalton Transactions*, vol. 40, no. 5, pp. 1047–1054, 2011.
- [20] I. Medina-Ramirez, J. L. Liu, A. Hernández-Ramirez et al., "Synthesis, characterization, photocatalytic evaluation, and toxicity studies of $\text{TiO}_2\text{-Fe}^{3+}$ nanocatalyst," *Journal of Materials Science*, vol. 49, no. 15, pp. 5309–5323, 2014.
- [21] X. Ma, J. Geiser-Lee, Y. Deng, and A. Kolmakov, "Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation," *Science of the Total Environment*, vol. 408, no. 16, pp. 3053–3061, 2010.
- [22] A. K. Shaw and Z. Hossain, "Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings," *Chemosphere*, vol. 93, no. 6, pp. 906–915, 2013.
- [23] J. Li, P. R. Chang, J. Huang, Y. Wang, H. Yuan, and H. Ren, "Physiological effects of magnetic iron oxide nanoparticles towards watermelon," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 13, no. 8, pp. 5561–5567, 2013.
- [24] C. Kole, P. Kole, K. M. Randunu et al., "Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytochemistry content

- in bitter melon (*Momordica charantia*),” *BMC Biotechnology*, vol. 13, article 37, 2013.
- [25] C. W. Lee, S. Mahendra, K. Zodrow et al., “Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*,” *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 29, no. 3, pp. 669–675, 2010.
- [26] S. W. Kim, J. H. Jung, K. Lamsal, Y. S. Kim, J. S. Min, and Y. S. Lee, “Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi,” *Mycobiology*, vol. 40, no. 1, pp. 53–58, 2012.
- [27] T. Murashige and F. Skoog, “A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures,” *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497, 1962.
- [28] P. M. G. Nair and I. M. Chung, “Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 21, no. 14, pp. 8858–8869, 2014.
- [29] Z.-M. Xiu, Q.-B. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, and P. J. J. Alvarez, “Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles,” *Nano Letters*, vol. 12, no. 8, pp. 4271–4275, 2012.
- [30] L. S. Dorobantu, C. Fallone, A. J. Noble et al., “Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 17, no. 4, 2015.
- [31] K. Gupta, R. P. Singh, A. Pandey, and A. Pandey, “Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 4, no. 1, pp. 345–351, 2013.
- [32] E. M. Ivanova, V. P. Kholodova, and V. I. V. Kuznetsov, “Biological effects of high copper and zinc concentrations and their interaction in rapeseed plants,” *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 57, no. 6, pp. 806–814, 2010.
- [33] S. K. Sethy and S. Ghosh, “Effect of heavy metals on germination of seeds,” *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, vol. 4, no. 2, pp. 272–275, 2013.
- [34] J. Wang, Y. Koo, A. Alexander et al., “Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations,” *Environmental Science and Technology*, vol. 47, no. 10, pp. 5442–5449, 2013.
- [35] F. B. Salisbury and C. V. Ross, *Fisiología vegetal*, Grupo Editorial Iberoamerica, Salomon, Mexico, 1994.
- [36] T. Lincoln and E. Zeiger, *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA, 5th edition, 2010.
- [37] G. Shams, M. Ranjbar, and A. Amiri, “Effect of silver nanoparticles on concentration of silver heavy element and growth indexes in cucumber (*Cucumis sativus* L. negeen),” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 15, article 1630, 2013.
- [38] J.-H. Kim, Y. Lee, E.-J. Kim et al., “Exposure of iron nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* enhances root elongation by triggering cell wall loosening,” *Environmental Science and Technology*, vol. 48, no. 6, pp. 3477–3485, 2014.
- [39] J. G. McEvoy and Z. Zhang, “Antimicrobial and photocatalytic disinfection mechanisms in silver-modified photocatalysts under dark and light conditions,” *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 62–75, 2014.
- [40] A. Emamverdian, Y. Ding, F. Mokhberdoran, and Y. Xie, “Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response,” *The Scientific World Journal*, vol. 2015, Article ID 756120, 18 pages, 2015.
- [41] E. Morteza, P. Moaveni, H. A. Farahani, and M. Kiyani, “Study of photosynthetic pigments changes of maize (*Zea mays* L.) under nano TiO₂ spraying at various growth stages,” *SpringerPlus*, vol. 2, no. 1, article 247, 2013.
- [42] P. M. G. Nair and I. M. Chung, “Study on the correlation between copper oxide nanoparticles induced growth suppression and enhanced lignification in Indian mustard (*Brassica juncea* L.),” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 113, pp. 302–313, 2015.
- [43] D. N. Feyissa, T. Løvdal, K. M. Olsen, R. Slimestad, and C. Lillo, “The endogenous *GL3*, but not *EGL3*, gene is necessary for anthocyanin accumulation as induced by nitrogen depletion in *Arabidopsis* rosette stage leaves,” *Planta*, vol. 230, no. 4, pp. 747–754, 2009.
- [44] Y.-Y. Syu, J.-H. Hung, J.-C. Chen, and H.-W. Chuang, “Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression,” *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 83, pp. 57–64, 2014.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización del doctorado, con número de registro 161906.

A la UAA y al Centro de Ciencias Básicas que facilitó la realización de mis estudios de posgrado.

A mi comité Tutorial, por formar parte del desarrollo de mi Tesis.

Dra. Iliana Medina Ramírez, por la asesoría como Tutora en la realización de este trabajo.

Dr. Plinio Guzmán, por la asesoría, las cepas, material y el apoyo brindado.

Dr. Roberto Rico Martínez, por la asesoría y el apoyo en el desarrollo de la tesis..

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez, por el apoyo en la realización de este trabajo con su asesoría, recursos y espacio en su laboratorio.

A los compañeros y técnicos del Laboratorio de Química de Materiales de la UAA, por su apoyo en la preparación de los materiales nanoestructurados.

A Laura Aguilar, del Laboratorio de Regulación Postranscripcional del CIVESTAV Irapuato por facilitar el material biológico.

A los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y de Toxicología Acuática de la UAA, por su apoyo en el desarrollo del trabajo experimental.

A la Coordinación del Doctorado

A mis hijos y mi esposo, por su amor, comprensión, apoyo y paciencia.

DEDICATORIAS

Con mucho cariño:

A mis hijos:

Francisco Emiliano y Luis Hernán

A mi esposo:

Francisco Morales

A mi mamá

A mi papá †

A mis hermanas, hermanos, sobrinas, sobrinos, cuñadas y cuñados.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE GENERAL

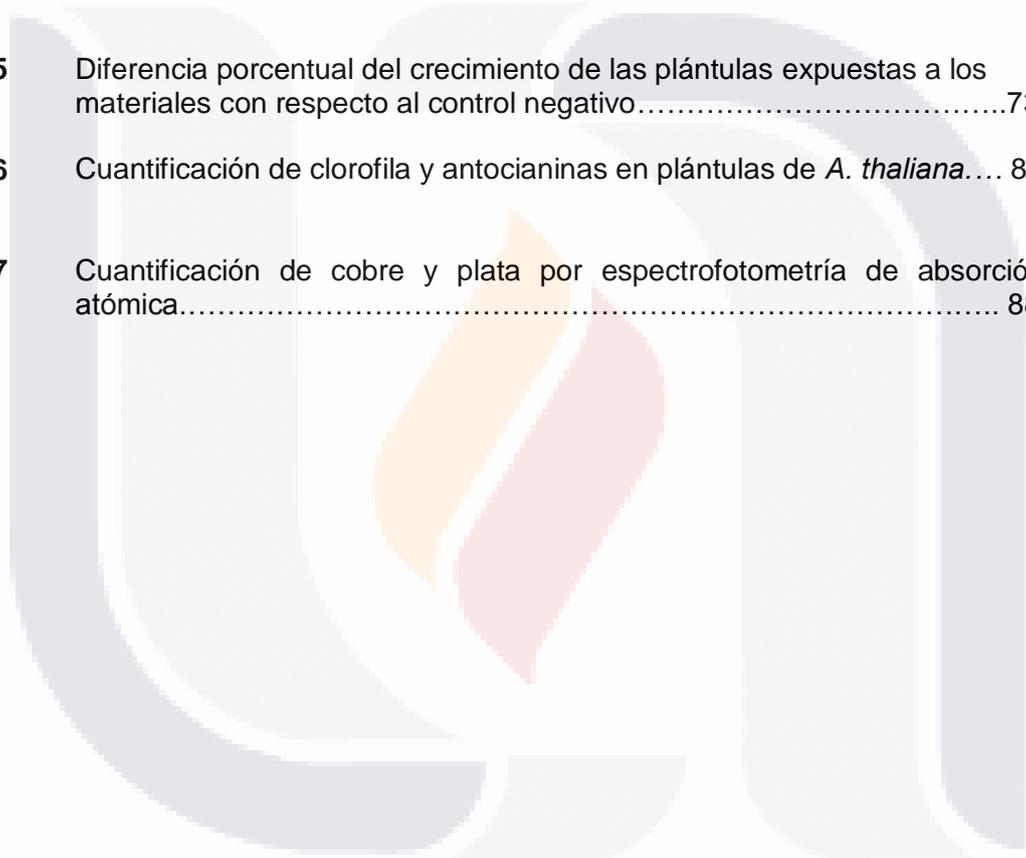
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ACRÓNIMOS.....	7
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	8
RESUMEN EN INGLÉS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Materiales nanoestructurados.....	10
1.2 Antimicrobianos.....	13
1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	15
1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.3 Nanotoxicología.....	17
1.3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.3.2 Cultivo de suspensiones de células vegetales.....	22
1.4 Biomarcadores.....	24
1.4.1 Catalasa.....	24
1.4.2 Ascorbato peroxidasa.....	26
1.4.3 Superóxido dismutasa.....	27
1.4.4 Antocianinas.....	28
1.4.5 Clorofila.....	28
1.4.6 Expansinas.....	29
1.4.7 Etileno.....	30
1.4.7.1 Mutantes de etileno.....	33
1.4.8 Proteínas LEA.....	34
1.5 Antecedentes de materiales nanoestructurados antimicrobianos.....	34
1.6 Antecedentes de efectos en plantas expuestas a materiales nanoestructurados.....	38
2. JUSTIFICACIÓN.....	45
3. HIPÓTESIS.....	47
4. OBJETIVOS.....	47
OBJETIVO GENERAL.....	47
OBJETIVOS PARTICULARES.....	47
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺ en <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i>	48
5.1.1 Cepas.....	48
5.1.2 Preparación de suspensión de microorganismos.....	48

5.1.3 Exposición de microorganismos a Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺	48
5.2 Evaluación de la actividad de los MNEs en la desinfección de semillas.....	49
5.3 Evaluación de la actividad de Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺ contra hongos contaminantes de semillas.....	49
5.4 Evaluación de los efectos de Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺ en <i>A. thaliana</i>	50
5.4.1 Material biológico.....	50
5.4.2 Evaluación del crecimiento	50
5.4.3 Evaluación del contenido de clorofila.....	51
5.4.4 Evaluación del contenido de antocianinas.....	51
5.4.5 Evaluación de la actividad de catalasa.....	51
5.4.6 Evaluación de la expresión genética.....	52
5.4.6.1 Extracción de RNA	52
5.4.6.2 Análisis por RT-PCR.....	52
5.5 Cuantificación de plata y cobre mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica	53
5.6 Observación al Microscopio Electrónica de Barrido	53
5.7 Análisis estadístico	54
6. RESULTADOS.....	55
6.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana los MNEs de Ag@TiO ₂ y de TiO ₂ -Cu ²⁺ en los organismos modelo <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> , y en la desinfección de semillas.	55
6.1.1 Evaluación de la actividad de los MNEs contra <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i>	55
6.1.2 Evaluación de la actividad de los MNEs en la desinfección de semillas	56
6.2 Evaluación de los efectos en <i>A. thaliana</i> , producidos por la interacción con los MNEs de Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺	61
6.2.1. Evaluación de la germinación y desarrollo de semillas expuestas a los MNEs	61
6.2.2 Evaluación del crecimiento de plántulas silvestres de <i>A. thaliana</i> expuestas a los MNEs	63
6.2.3. Evaluación del crecimiento de plántulas mutantes de <i>A. thaliana</i> expuestas a los MNEs	73
6.2.4. Evaluación del crecimiento de plántulas en presencia de Ag@TiO ₂ y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	79
6.2.5 Evaluación del contenido de clorofila y antocianinas en plántulas expuestas a los MNEs	81
6.2.6 Evaluación de la actividad de catalasa en plántulas expuestas a los MNEs	83
6.2.7 Evaluación de la expresión genética en plántulas expuestas a los MNEs	85
6.2.8 Cuantificación de plata y cobre en plántulas expuestas a los MNEs y en medios de exposición.....	87
6.2.9 Observación por Microscopía Electrónica de Barrido de plántulas expuestas a los MNEs	89
6.3 Evaluación de los efectos en cultivos de células vegetales, producidos por la interacción con los MNEs de Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺	93

6.3.1 Evaluación de la actividad de catalasa en cultivos de células vegetales expuestos a los MNEs	93
6.3.2 Evaluación de la expresión genética en cultivos de células vegetales expuestos a los MNEs	95
7. DISCUSIONES	97
9. BIBLIOGRAFÍA	125
APÉNDICE	139
MEDIOS DE CULTIVO	139
LB (Luria-Bertani)	139
PD (Papa-Dextrosa)	139
MS (Murashige-Skoog)	139
SOLUCIONES	140
Buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.....	140
Buffer de extracción de proteínas.....	140
Reactivo de Bradford.....	140
Estándar de albúmina sérica de bovino	140
Buffer de reacción de catalasa.....	140
Buffer de lisis para RNA	140
Acetato de potasio 5 M	140
Fenol-cloroformo (1:1)	141
Cloroformo-alcohol isoamílico (49:1).....	141
Cloruro de litio 6 M	141
TAE 10X pH 8.....	141
EDTA 0.5 M pH 8	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Desinfectantes y antisépticos.....	15
Tabla 2.	Propiedades antimicrobianas de materiales nanoestructurados de dióxido de titanio.....	37
Tabla 3.	Efectos observados en plantas por exposición a diferentes materiales nanoestructurados.....	42
Tabla 4.	Oligonucleótidos empleados para el análisis de RT-PCR.....	53
Tabla 5	Diferencia porcentual del crecimiento de las plántulas expuestas a los materiales con respecto al control negativo.....	73
Tabla 6	Cuantificación de clorofila y antocianinas en plántulas de <i>A. thaliana</i>	82
Tabla 7	Cuantificación de cobre y plata por espectrofotometría de absorción atómica.....	88

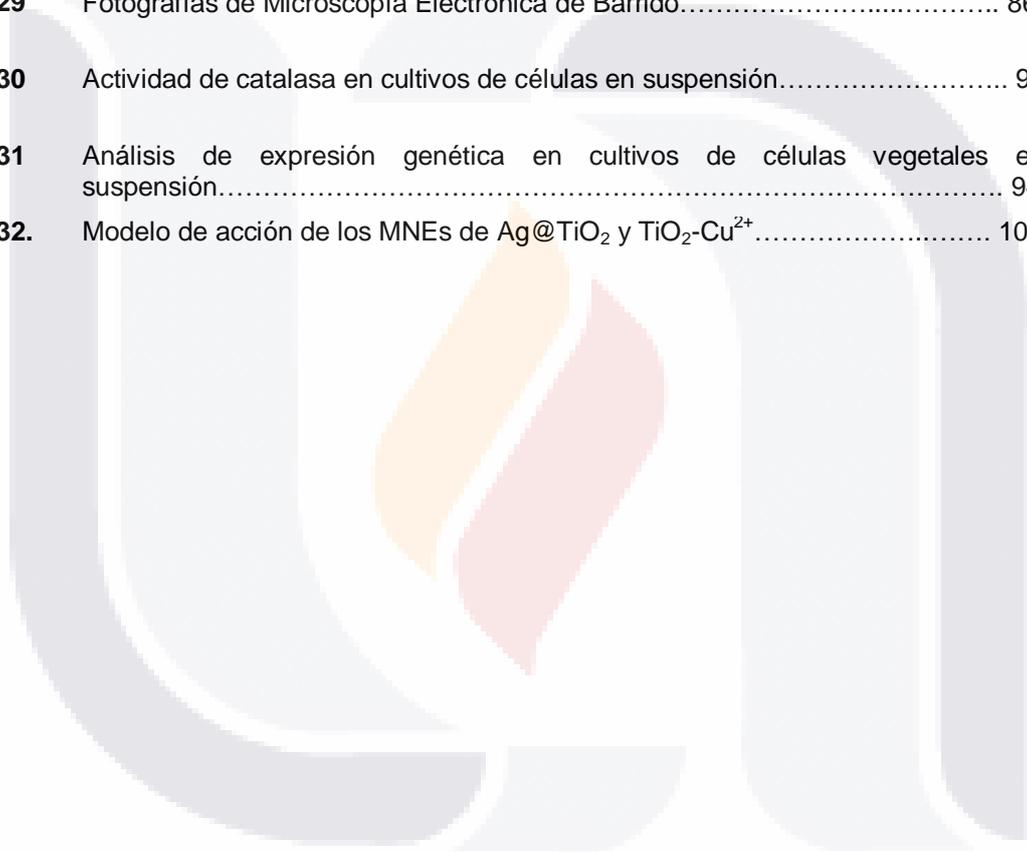


TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de la reacción de fotocatalisis.....	13
Figura 2.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Figura 3	Cultivos de células vegetales en suspensión.....	23
Figura 4	Esquema de reacción óxido-reducción de la catalasa.....	25
Figura 5	Actividad de la ascorbato peroxidasa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno.....	26
Figura 6	Distribución de las superóxido dismutasa en la célula vegetal.....	27
Figura 7	Modelo de acción de las expansinas.....	28
Figura 8	Ruta de formación del etileno.....	31
Figura 9	Modelo de acción del etileno.....	32
Figura 10	Mutantes insensibles a etileno y silvestre de <i>A. thaliana</i>	33
Figura 11	Mecanismos de toxicidad de los materiales nanoestructurados de dióxido de titanio dopado con metales.....	36
Figura 12	Modelo de ingreso de los materiales nanoestructurados a la planta.....	41
Figura 13	Inactivación logarítmica de microorganismos.....	57
Figura 14	Semillas y sus contaminantes tratados con Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺	60
Figura 15	Germinación y desarrollo de semillas.....	62
Figura 16	Plántulas de <i>A. thaliana</i> incubadas en diferentes condiciones.....	67
Figura 17	Gráficas de elongación de <i>A. thaliana</i> incubadas en diferentes condiciones.....	68
Figura 18	Plántulas de <i>A. thaliana</i> expuestas a Ag@TiO ₂ durante distinto tiempos.....	69
Figura 19	Gráficas de elongación de plántulas de <i>A. thaliana</i> expuestas a Ag@TiO ₂ durante distintos tiempos.....	70
Figura 20	Plántulas de <i>A. thaliana</i> expuestas a TiO ₂ -Cu ²⁺ durante distintos tiempos.....	70
Figura 21	Gráficas de elongación de plántulas de <i>A. thaliana</i> expuestas a TiO ₂ -Cu ²⁺ durante distintos tiempos.....	71
Figura 22	Plántulas de <i>A. thaliana</i> silvestres y mutantes insensibles a etileno.....	72

Figura 23	Gráficas de elongación de plántulas de <i>A. thaliana</i> mutantes insensibles a etileno y silvestre expuestas un día.....	76
Figura 24	Gráficas de elongación de plántulas de <i>A. thaliana</i> mutantes insensibles a etileno y silvestre expuestas una semana.....	77
Figura 25	Plántulas de <i>A. thaliana</i> tratadas con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y Ag@TiO ₂	78
Figura 26	Gráficas de elongación de plántulas de <i>A. thaliana</i> expuestas a Ag@TiO ₂ en presencia de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.....	80
Figura 27	Actividad de catalasa en plántulas.....	82
Figura 28	Análisis de expresión genética en plántulas.....	84
Figura 29	Fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido.....	86
Figura 30	Actividad de catalasa en cultivos de células en suspensión.....	90
Figura 31	Análisis de expresión genética en cultivos de células vegetales en suspensión.....	94
Figura 32.	Modelo de acción de los MNEs de Ag@TiO ₂ y TiO ₂ -Cu ²⁺	104



ACRÓNIMOS

ACC: ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico

Ag@TiO₂: material nanoestructurado de dióxido de titanio dopado con plata

APX: ascorbato peroxidasa

DNA: ácido desoxirribonucleico

CAT: catalasa

Cla: clorofila a

Clb: clorofila b

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético (etilendiamino tetraacetic acid)

EROs: especies reactivas de oxígeno

IR: índice radial

LB: Luria-Bertani, medio de cultivo para bacterias

MDE: malondialdehído

MNEs: materiales nanoestructurados

MS: Murashige-Skoog, medio de cultivo para plantas

N: número de réplicas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD: Papa-Dextrosa, medio de cultivo para hongos.

p: probabilidad

PVP: polivinilpirrolidona

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción

SDS: dodecilsulfóxido de sodio

SOD: superóxido dismutasa

TiO₂-Cu²⁺: material nanoestructurado de dióxido de titanio dopado con cobre (II).

U log: unidades logarítmicas

URA: unidades relativas de antocianinas

UV: ultravioleta

RESUMEN EN ESPAÑOL

En este trabajo se analizaron la actividad antimicrobiana y algunos efectos a nivel de crecimiento, desarrollo, bioquímica y de expresión genéticos en *Arabidopsis thaliana* de los materiales nano-estructurados (MNEs) de dióxido de titanio dopados con plata (Ag@TiO_2) y con cobre ($\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$). Estos MNEs son activos bajo irradiación de luz visible, tienen un tamaño de 10 a 12 nm, una forma cristalina anatasa y liberan iones (Ag^+ y Cu^{2+}). La actividad antimicrobiana se evaluó en *Escherichia coli* C600 y *Saccharomyces cerevisiae* W303a tratados con varias concentraciones de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, bajo irradiación y en la oscuridad, y en diferentes tiempos. Ag@TiO_2 presentó una mayor actividad contra *E. coli* C600 que con *S. cerevisiae* W303a, ya que se logró una inactivación logarítmica (U log) de *E. coli* de 2.2 U log al utilizar 0.5 mg/ml por 4 h, mientras que en *S. cerevisiae* una inactivación de 2.6 U log con 10 mg/ml por 24 h. Con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ no se observó inactivación significativa en *E. coli*, en cambio en *S. cerevisiae* se observó una inactivación de 1.9 U log con 10 mg/ml por 24 h. El uso de ambos MNEs para la desinfección de semillas para su cultivo *in vitro* en condiciones axénicas, resultó ser ineficaz, ya que hubo crecimiento de hongos filamentosos. Estos hongos fueron aislados y tratados con estos MNEs, observándose una leve inhibición. En semillas de *A. thaliana* Col-0 expuestas a ambos MNEs no afectaron germinación ni desarrollo; sin embargo, las plántulas expuestas a estos MNEs modificaron su crecimiento, resultando plántulas de mayor longitud al exponer a 0.5 y 1 mg/ml de Ag@TiO_2 por un día; y de menor longitud con 1 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Las plántulas expuestas a 1 mg/ml de los MNEs presentaron un contenido mayor de clorofila que las del control negativo, mientras que las expuestas a concentraciones igual o mayores que 2.5 mg/ml de los MNEs, mostraron una reducción de la clorofila total. El contenido de antocianinas en plántulas expuestas por un día fue significativamente mayor que el control negativo en plántulas expuestas a 5 mg/ml de Ag@TiO_2 y 2.5 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. La expresión de los genes *APX* y *SOD* en las plántulas expuestas a Ag@TiO_2 fue mayor que en las expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Mediante Espectrometría de Absorción Atómica, se detectaron altas cantidades de plata en las plantas expuestas a Ag@TiO_2 y cobre en las expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$

RESUMEN EN INGLÉS

This work analyzed the antimicrobial efficiency and physical, biochemical and genetic effects on *Arabidopsis thaliana* of Nano-structured materials (NSMs) of Silver (Ag@TiO_2) and copper ($\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$) doped titanium dioxide were analyzed in this work. These materials are active under visible light, exhibit a small size (10-12 nm), are crystalline (anatase) and liberate metal ions (Ag^+ , Cu^{2+}) in solution. Antimicrobial activity was observed in *E. coli* C600 and *S. cerevisiae* W303 strains treated with several concentrations of Ag@TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ under different conditions: radiated, no-radiated, and after different times of exposition. Higher activity was achieved with Ag@TiO_2 in *E. coli* C600, with an inactivation of 2.2 units log with 0.5 mg/ml after 4 h, than for *S. cerevisiae*, with a log inactivation of 2.6 with 10 mg/ml after 24 h. Ag@TiO_2 was more active than $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Besides, disinfection of seeds for cultivation *in vitro* was evaluated, and these NSMs were ineffective for this purpose, as filamentous fungi treated with these NSMs showed slight inhibition. Also, the effects of these NSMs were evaluated in *A. thaliana* Col-0 strain. Seeds exposed to NSMs did not show effects on germination and growth. However, seedlings treated with these materials modified their growth, larger seedlings were observed with 0.5 and 1 mg/ml of Ag@TiO_2 after 24 h exposition; and smaller seedlings with 1 mg/ml of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. These effects were related with the antagonism between silver and ethylene, in the first case; and with a higher production of ethylene, in the second case. Seedlings exposed to 1 mg / ml of NSMs for a week had a higher content of chlorophyll than the negative control, and seedlings exposed to 2.5 mg/ml of NSMs showed a reduction of total chlorophyll. The anthocyanins in seedlings exposed to 5 mg/ml Ag@TiO_2 and 2.5 mg/ml of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ for one day were significantly higher than the negative control. Seedlings exposed to Ag@TiO_2 showed increased expression of genes *SOD* and *APX* than seedling exposed to the $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Through Atomic Absorption Spectrometry, high concentration of silver was found in seedling exposed to Ag@TiO_2 , and of copper seedlings exposed to $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. By Scanning Electron Microscopy, loose materials were observed on the surface of seedlings exposed to NSMs.

1. INTRODUCCIÓN

Los materiales nanoestructurados (MNEs) tienen propiedades fisicoquímicas únicas, diferentes a las de los mismos materiales con mayores dimensiones, por lo que actualmente están siendo utilizados en la elaboración de diversos productos. La producción de MNEs ha ido en aumento, generándose una gran cantidad mediante técnicas de ingeniería (Shi *et al.*, 2013). Algunos de estos MNEs han sido evaluados por su actividad antibacteriana y se están utilizando como desinfectantes o en la purificación de agua contaminada con microorganismos o sustancias orgánicas. El uso de los MNEs ha resultado muy conveniente debido a su bajo costo de producción y por actividad contra un amplio espectro de microorganismo (Pramakin *et al.*, 2012).

Sin embargo, el interés científico no sólo va encaminado a valorar la aplicabilidad de los MNEs, sino también a conocer el impacto ambiental que pueda conllevar al entrar en contacto con otras formas de vida. La investigación de la interacción de MNEs con plantas es de especial importancia, ya que las plantas están directamente expuestas al suelo, agua y aire, donde eventualmente pudieran estar dispersos. La respuesta de las plantas a la exposición de los MNEs ha sido muy diversa. En algunas investigaciones, plantas expuestas a MNEs han presentado un aumento en el desarrollo (Kumar *et al.*, 2013), mientras que en otras se ha observado una disminución (Nair & Chung, 2014 a). La razón de la diversidad de resultados ha sido atribuida a factores como la composición, tamaño y forma de los MNEs, a la sensibilidad de la planta expuesta (Dietz & Hearsh, 2011) y al método de evaluación (Josko & Oleszczuk, 2014). Los efectos en las plantas, están directamente relacionados con la manera en que los MNEs se asocian a éstas, de manera que algunos trabajos han investigado si se fijan en la superficie de las plantas o si se transportan al interior (Miralles *et al.*, 2012 a).

1.1 Materiales nanoestructurados

Los MNEs son partículas formadas por unas decenas o centenas de moléculas o átomos, cuyas dimensiones oscilan entre 1 y 100 nm. Los MNEs han existido en el planeta por siglos, son generados de forma natural en procesos bióticos y abióticos, o de manera artificial mediante procesos químicos (Klain *et al.*, 2008). Sus propiedades fisicoquímicas como temperatura de fusión, absorción óptica y reactividad química,

son muy diferentes a las de los materiales de mayor tamaño de la misma composición (Shi *et al.*, 2013).

Algunas civilizaciones antiguas como la egipcia o la china utilizaban los MNEs aprovechando sus propiedades ópticas y medicinales. En los años cincuenta del siglo pasado, el Físico Richard Feynman propuso fabricar productos en base a un reordenamiento de átomos y moléculas, con lo que surgió la nanotecnología (Pool & Owens, 2003). Existe actualmente un notable interés científico y tecnológico por los MNEs, hacia el año 2013 se tenían registrados 1628 productos hechos a base de MNEs en 30 países (Santaella *et al.*, 2014). Actualmente están siendo utilizados en la elaboración de diversos productos en áreas como a) la industria farmacéutica, b) deportiva, c) cosmética, d) en la desinfección de agua y aire, entre otras (Lee *et al.*, 2010).

Existen diferentes maneras de clasificar los MNEs, entre éstas, los materiales pueden ser clasificados de acuerdo a su composición. Las principales categorías de MNEs comprenden a los hechos a base de carbón, los óxidos metálicos, lípidos, metales cero-valentes, nanopolímeros y dendrímeros, con diferentes características tales como nanofibras, nanoalambres y nanohojas (Aslani *et al.*, 2014). Los investigadores tienen un especial interés en los MNEs del tipo óxido metálico, debido a su amplia gama de propiedades eléctricas y ópticas y sus aplicaciones como semiconductores. Los MNEs de TiO_2 han sido muy estudiados ya que son químicamente estables, poco tóxicos, económicos y tienen una fuerte actividad fotocatalítica (Banerjee *et al.*, 2011). La propiedad fotocatalítica es una característica propia de los MNEs de TiO_2 , ya que al ser expuestos a radiación ultravioleta 390 nm (UV) absorben energía con la que el electrón de valencia puede ser excitado a la banda de conducción, posteriormente este electrón es transferido a una molécula aceptora como el O_2 , generándose la especie superóxido ($\cdot\text{O}_2$), proceso conocido como foto-reducción; simultáneamente, en el lugar de la banda de valencia queda un espacio vacío, llamado hueco electrónico, con la capacidad de atraer electrones y que necesita ser llenado, para esto una molécula dona un electrón, la especie donante puede ser el agua (H_2O), produciéndose el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), proceso conocido como foto-oxidación (Fig. 1a y 1b) (Wilker *et al.*, 2012).

El dopaje de MNEs de TiO_2 con metales, proporciona propiedades diferentes a las que presentan los MNEs de TiO_2 puros, porque se reduce la banda prohibida y la

actividad fotocatalítica se produce en el espectro de la luz visible, a diferencia de los MNEs de TiO_2 que se activan por radiación UV (Pan *et al.*, 2010). Esto puede representar una ventaja si se aplica luz solar, ya que sólo el 5% es luz UV, mientras que el 45% es luz visible (Akhavan, 2009). Los metales que han sido empleados para el dopaje del TiO_2 son plata, cobre, zirconio, zinc, hierro, cromo, níquel, manganeso, cobalto, tungsteno, antimonio, estaño, oro, platino, vanadio y molibdeno también han sido utilizados algunos no-metales, tales como boro, carbono, nitrógeno, azufre y flúor, con el mismo propósito, que el MNEs tenga actividad fotocatalítica al ser irradiado con luz visible (Cong *et al.*, 2007, Barnejee 2011). Otra estrategia utilizada con este fin, es la combinación de MNEs de TiO_2 con otro material, para formar nanocompuestos y aprovechar la luz solar en la fotocatalisis. Algunos de los materiales que han sido empleados son CdS , CdSe , CdTe , PbS , Bi_2S_3 , CuInS_2 asociados al TiO_2 , también se han elaborado en forma de núcleo de un material como plata envuelto en capas de TiO_2 , o combinado con carbón activado o nanotubos de carbono (Barnejee 2011).

El cobre y los óxidos de cobre han sido empleados como dopantes del TiO_2 , porque forman MNEs estables con actividad fotocatalítica útil en la degradación, efectivo en la fotorreducción del CO_2 y productor de H_2 , aunque se ha observado que estos materiales son más tóxicos que el TiO_2 puro. Estructuralmente, los dopantes de cobre pueden reemplazar al Ti de su sitio en la estructura cristalina o pueden ser incorporados en sitios intersticiales y segregarse a la superficie (Sahu & Biswas, 2011). El cobre puede ser liberado del MNEs y penetrar a la célula produciendo daño por diversos mecanismos: debido a sus propiedades oxido-reducción, generar radicales $\bullet\text{OH}$ en reacción tipo Fenton, reaccionar con grupos sulfhidrilo de proteínas, o reemplazar al zinc u otros metales asociados a proteínas, restándole funcionalidad (Grass *et al.*, 2011). El TiO_2 es un excelente soporte de plata debido a su pequeño tamaño y relativamente gran superficie. La plata mejora las propiedades fotocatalíticas del TiO_2 , ampliando la excitación con luz visible, y aumenta sus propiedades antibacterianas con un dopaje de 1 mol% Ag en TiO_2 . A las propiedades fotocatalíticas se le suman las propiedades antibacterianas de la plata, donde el ion Ag^+ puede enlazarse a la pared celular bacteriana dañarla y alterar su funcionalidad. Ag, puede interactuar con grupos tiol de proteínas, inactivando diversas enzimas y propiciando la generación de especies reactivas de oxígeno; o también puede interactuar con el DNA, evitando la reproducción bacteriana (Akhavan, 2009).

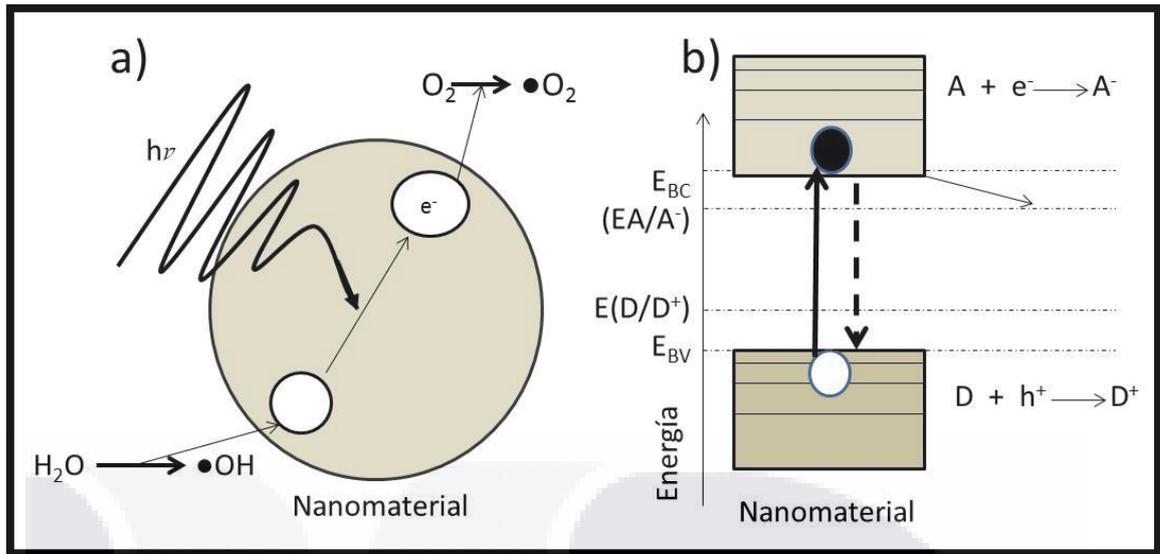


Figura 1. Representación esquemática de la reacción de fotocatalisis. (a) Electrón excitado por radiación ($h\nu$), en caso de TiO_2 por UV con una $\lambda \leq 390$ nm, migra de la banda de valencia a la banda de conducción y de ahí es cedido a una molécula receptora, generalmente O_2 para convertirse en el radical superóxido ($\bullet\text{O}_2$); mientras que el hueco de valencia es llenado por un electrón que cede una especie donante, que puede ser H_2O_2 para convertirse en el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). (b) Diagrama del nivel de energía por reacción fotocatalítica, se indican los requerimientos energéticos para bandas de conducción (E_{BC}) y de valencia (E_{BV}) con respecto a la reducción de potenciales del donador (D) y del aceptor (A) ($E(D^+/D)$ y $E(A/A^-)$). (Basado en Wilker *et al.*, 2012).

1.2 Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias químicas que son capaces de inhibir o destruir microorganismos, y se han clasificado en selectivos, como los antibióticos, y no-selectivos, como los desinfectantes y antisépticos. Los antibióticos son agentes de uso sistémico y tópico; los antisépticos son sustancias empleadas en piel y mucosas en tejidos vivos; los desinfectantes se emplean en medios inertes. Los antimicrobianos pueden inhibir el metabolismo (microbiostáticos) o matar (microbicidas) a los microorganismos. Los antibióticos poseen toxicidad selectiva, sus mecanismos de acción aprovechan las diferencias bioquímicas y celulares entre los microorganismos y el hospedero para ejercer su acción. En tanto que los antisépticos y desinfectantes actúan con mecanismos que pueden afectar sin selectividad a las diferentes células (Tabla 1). Características deseables de los antisépticos y desinfectantes son tener

actividad antimicrobiana a bajas concentraciones, con amplio espectro de acción sobre bacterias, virus y hongos, microbicidas en tiempo corto, ser estables en diferentes condiciones, producir soluciones homogéneas, compatible con otros desinfectantes que pudieran usarse simultáneamente, no ser tóxicos para los seres vivos, no ser corrosivos para diferentes superficies. Sin embargo, difícilmente los antisépticos y desinfectantes actualmente en uso, cumplen con todas las características. Incluso, algunos presentan algunas desventajas de uso, como los alcoholes que afectan superficies de plástico; el hipoclorito de sodio que es corrosivo y su actividad se ve limitada en presencia de materia orgánica; el peróxido de hidrógeno que es corrosivo y destruye tejidos vivos; los fenoles son tóxicos (Negroni, 2009). Algunos MNEs presentan características deseables como desinfectantes y antisépticos (Thomas & Webster, 2012).

La efectividad de los agentes antimicrobianos debe evaluarse para determinar la cantidad que se requiere para inhibir o matar a los microorganismos. Existen diversas técnicas para determinar la actividad antimicrobiana, que miden la viabilidad de los microorganismos después de la exposición al agente antimicrobiano: medición de la densidad óptica, dispersión en cajas con medio sólido y conteo de colonias, tinción selectiva entre células vivas y muertas, entre otros. La técnica de dispersión en cajas, proporciona resultados muy seguros, los microorganismos viables después de la exposición con el agente antimicrobiano, son incubados en medio sólido para contar las unidades formadoras de colonia, y relacionar este número con el obtenido con microorganismos sin exponer (Thomas & Webster, 2012). Los resultados pueden ser reportados en unidades logarítmicas, que representan la inactivación de los microorganismos producidos por el agente (Lee *et al.*, 2008). La actividad de los antimicrobianos debe ser evaluada en diversas especies de microorganismos, bacterias u hongos (Seit & Webster, 2012). Se describen a continuación una especie de bacteria, *Escherichia coli* y una de hongo *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 1 Desinfectantes y antisépticos		
Clasificación	Ejemplo	Mecanismo de acción
Ácidos	Ácido benzoico	Ruptura de los grupos sulfhidrilo de proteínas de membrana y con actividad enzimática.
Alcoholes	Etanol	Desnaturalización de proteínas por inhibición de la producción de metabolitos esenciales en presencia de agua.
Aldehídos	Formaldehído	Alquilación de proteínas, con pérdida de actividad enzimática.
Halogenados	Hipoclorito de sodio	Daño a ácidos nucleicos, desnaturalización de proteínas e inactivación de enzimas.
Detergentes catiónicos	Cloruro de benzalconio	Ruptura de membrana, desnaturalización de proteínas e inactivación de enzimas,
Fenoles	Fenol	Desnaturalización de proteínas
Metales	Plata	Interacción con grupos sulfhidrilo de proteínas, favorece salida de K ⁺ , inhibe división celular y alteración de la pared celular.
Oxidantes	Peróxido de hidrógeno	Oxidación de los componentes de la célula microbiana.
Tenso activos aniónicos	Jabones	Eliminación de los microorganismos por arrastre.
Materiales nanoestructurados	Nanopartículas metálicas	Interacción del metal con pared celular, DNA, proteínas de membrana y enzimas, y generación de EROs.

Información tomada de Negroni, 2009, Velazquez, 2008, Eckhardt, 2013.

1.2.1 Escherichia coli

E. coli es una bacteria Gram negativa, bacilar, flagelada de la familia Enterobacteriaceae, subclase proteobacterias γ , de respiración facultativa. Mide alrededor de 2.5 μm de largo por 0.8 μm de diámetro. Comúnmente se encuentra en el tracto digestivo de muchos animales, previniendo la invasión de levaduras y hongos, que suelen ser menos benignos que esta bacteria. Aunque algunas cepas de *E. coli* producen infecciones en vías urinarias, diarrea o incluso mortandad en niños, la mayoría de las cepas son inocuas. *E. coli* es uno de los más simples y mejor entendidos seres vivos. Ha sido un organismo modelo para estudios de evolución experimental; de bioquímica, para entender estructuras e interacciones de moléculas

que participan en diversos procesos; para estudios genetistas, para identificar los genes que se activan o se silencian en determinadas condiciones (Berg, 2003). Originalmente fue seleccionada como modelo por su capacidad de crecer en medio definido de manera rápida, se duplica cada 20 min. En últimas fechas, dada su fácil manipulación genética, ha sido elegido como medio de propagación, manipulación y caracterización de DNA recombinante (Berg, 2003).

La cepa de laboratorio K12 de *E. coli* ha sido la más utilizada como organismo modelo, y una variante de esta la MG1655 fue secuenciada en 1997. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 11% tiene funciones de regulación, y el 0.7% se desconoce su función. El estudio comparativo con otros genomas bacterianos secuenciados, indica que el genoma de *E. coli* es dinámico, y que el 17% de sus genes son adquisiciones foráneas relativamente recientes (Lawrence & Ochman, 1998). Los elementos extracromosomales, plásmidos, son aún más dinámicos, esta bacteria puede no tener o tener una gran cantidad de plásmidos (Hopwood & Chater, 1989). Los plásmidos pueden transferirse entre células de diferente origen filogenético, proporcionando características nuevas al receptor como son la capacidad de asimilar azúcares raros, de producir sustancias que matan a posibles competidores, resistencia a antibióticos y a metales pesados, inmunidad contra fagos, entre otros (Lewin, 1998). Esto le ha permitido adaptarse a vivir en diferentes ambientes, y puede encontrarse como organismo de vida libre, comensal o patógeno. Se cuenta con una gran variedad de cepas de *E. coli* derivadas de la K-12, como la C 600 (Appleyard, 1954) cuyo genotipo (F⁻ tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ-) indica que cuenta con la capacidad de infección con el vector M13, requiere leucina para su crecimiento, no tiene la capacidad de percibir lactosa del medio (Casali & Preston, 2003). *E. coli* es un modelo excelente para la evaluación de agentes antimicrobianos.

1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es una levadura, un hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos. Es el microorganismo eucarionte más estudiado, ya que ofrece muchas ventajas como modelo de investigación. *S. cerevisiae* tiene un genoma pequeño comparado con otros eucariontes. Fue el primer eucarionte en ser secuenciado en 1996. Las células de esta levadura pueden proliferar en estado haploide o diploide, la forma haploide contiene 16 cromosomas, con un 72% que codifica para proteínas. Parte de su genoma es mitocondrial, que participan en el

metabolismo respiratorio. Contiene además el plásmido 2μ , y la mayoría de las cepas contienen virus de RNA de doble cadena. Presenta un ciclo de vida vegetativo, donde la levadura se divide por gemación; y un ciclo de vida sexual, donde los dos tipos sexuales α y a , determinados por un par de alelos heterocigotos $MATa$ y $MAT\alpha$, que si se cultivan juntos se forma una cepa diploide $MATa/MAT\alpha$. Entonces la célula se divide por meiosis dando lugar a cuatro células haploides, contenidas dentro de un saco denominado asca. *S. cerevisiae* se reproduce rápidamente, duplicándose en alrededor de 90 min en condiciones ideales y es un organismo no patógeno, características que lo hacen ideal para estudios de laboratorio. La cepa W303 tiene el siguiente genotipo $MATa/MAT\alpha$ [*leu2-3,112trp1-1can1-100ura3-1ade2-1his3-11,15*] [*phi**] (Rothstein, 1977). *S. cerevisiae* es una levadura que puede generar información de la eficacia de agentes antimicrobianos (Giannousi *et al.*, 2014, Hadduck *et al.*, 2010).

1.3 Nanotoxicología

Aunque los MNEs se producen naturalmente y se utilizan desde hace siglos, la producción y uso en las últimas décadas ha propiciado su liberación al medio ambiente en cantidades crecientes, se calcula que para el año 2020, se estará desechando medio millón de toneladas de MNEs, que podrán interactuar con diferentes formas de vida (Maurer-Jones *et al.*, 2013). La nanotoxicología estudia los efectos adversos que pueden ocasionar los MNEs en los organismos, teniendo como misión implementar estrategias nanotecnológicas seguras y responsables, mediante estudios toxicológicos y ecotoxicológicos. Los tres elementos que se han considerado claves para establecer la toxicidad de los MNEs son: (1) hacer la caracterización fisicoquímica del material, determinar tamaño, forma, área superficial, solubilidad, agregación; (2) realizar estudios *in vitro* e (3) *in vivo*, tanto si se piensa en efectos en humanos como en ecosistemas (Kahru & Dobourguier, 2010).

Cuando se habla de toxicidad en ecosistemas, se utiliza el término ecotoxicología, entonces es necesario medir los efectos de las sustancias en diferentes niveles tróficos incluyendo microorganismos, plantas, hongos, animales invertebrados y vertebrados, y si las sustancias que se evalúan son MNEs, entonces se habla de nanoecotoxicología. Para hacer estos estudios, los protocolos especifican las condiciones fisiológicas en que se realizan, los tiempos de exposición y los parámetros que se evalúan. Es importante considerar las modificaciones que sufren

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los MNEs al entrar en contacto con el medio de exposición (Rana & Kalaichelvan, 2013).

Las plantas son los organismos que están expuestos a los contaminantes presentes en el agua, tierra y aire. Los MNEs, que pueden estar dispersos en estos ambientes, pueden entrar en contacto con las plantas afectando su desarrollo. Por lo que es necesario evaluar los posibles efectos adverso originados como consecuencia de la exposición a MNEs. Por otro lado, las plantas pueden adsorberlos en su superficie o incluso trasladarlos a su interior, persistiendo su asociación con las plantas y entrando a la cadena alimenticia. Para entender el impacto que tienen los MNEs en los ecosistemas, es necesario evaluar los efectos que producen en las plantas (Dietz & Herth, 2011). Varias plantas pueden ser empleadas para realizar esta evaluación, entre éstas *Arabidopsis thaliana*.

Las evaluaciones de los efectos de la exposición a MNEs, se llevan a cabo en plantas que los investigadores seleccionan frecuentemente de la guía de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (www.epa.gov: *Environmental Protection Agency*), para pruebas químicas, en donde se recomienda, para ensayos de fitotoxicidad, plantas como jitomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*), calabacita (*Cucurbita pepo*), rábano (*Raphanus sativus*), arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum spp*) aunque también hay estudios realizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Miralles *et al.*, 2012a). Los estudios encaminados a evaluar los efectos de MNEs en plantas, se han basado en la observación de aspectos físicos, bioquímicos, de expresión genética y de bioacumulación, en los que se han encontrado una gran diversidad de efectos, que han sido considerados positivos, negativos y nulos (Dietz & Herth, 2011). Características de los MNEs, como composición, forma, tamaño, repercuten directamente en los efectos en las plantas. Debido a esto, su caracterización es muy importante, y muchos investigadores, de la misma manera que reportan los efectos en plantas, reportan resultados de análisis como difracción de rayos X, para determinar las fase cristalina y la proporción de cada componente de los nanocompósitos; microscopía electrónica de transmisión y de barrido, para observar forma y medir dimensiones de los MNEs; determinación de potencial Z, para determinar carga eléctrica y tamaño hidrodinámico; espectroscopia de energía dispersiva de rayos X, para determinar composición elemental (Pan *et al.*, 2010).

1.3.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis es un género de plantas que pertenecen a la familia Brassicaceae, cuenta con varias especies, pero la más conocida es *A. thaliana* (L.) (Fig. 2). Otras especies de esa familia son el nabo (*Brassica napus*), el rábano (*Raphanos sativus*), la col (*Brassica oleraceae*). *A. thaliana* cuenta con una serie de características que la hacen un organismo modelo para la investigación de diversos aspectos de plantas (Wilson, 2000):

1. Es una planta pequeña, que ocupa poco espacio. Crece vegetativamente como una roseta de entre 2 y 5 cm de diámetro, del cual emerge un tallo floral o inflorescencia primaria que puede tener una altura de entre 20 y 30 cm y varias inflorescencias secundarias que tienen hojas caulinas y flores. Las flores tienen 3 mm de largo por 1 mm de ancho, cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres, y un ovario.

2. Tiene un ciclo de vida corto, en 6 a 8 semanas se desarrolla a planta adulta.

3. Es una planta facultativa, pues se desarrolla completamente en diferentes fotoperiodos que van de 24 h hasta 6 h luz por día. Cuando se desarrolla en la oscuridad se producen plántulas blancas o etioladas.

4. Genera una gran cantidad de semillas. Es una planta autógama, produce varias vainas o silicuas con alrededor de 50 semillas cada una, y una planta puede producir hasta 10 000 semillas.

5. Tiene todas las características de una angiosperma, aunque en comparación con otras, *A. thaliana* tiene un genoma relativamente pequeño (100-120 X 10⁶ pb), sólo 15 veces más grande que el de *E. coli* y 8 veces mayor que el de *S. cerevisiae*. Se terminó de secuenciar su genoma en el 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Se calcula que cuenta con 33 000 genes, un número similar al de otras plantas.

6. Existen diversos ecotipos, variantes de la misma especie, entre los que se cuenta el Columbia.

7. Se han desarrollado una colección de mutantes que pueden ser utilizadas como herramienta en diversos estudios. Entre las que se cuentan mutantes que tienen afectada alguna ruta metabólica, que presentan una coloración diferente, que tienen modificado el tiempo de floración, de desarrollo aberrante, que tienen alterada la respuesta a hormonas, como a etileno (ver sección 1.16) que tienen afectada la

habilidad de responder a la luz entre otras. También hay una colección de plantas transgénicas.

8. Hay un gran repertorio de recursos informáticos especializados en *A. thaliana* disponibles en Internet.

9. La investigación con *A. thaliana* es más sencilla que con otras plantas, y los resultados son potencialmente aplicables a otras especies vegetales de interés agrícola o de las que se obtiene un beneficio en el mantenimiento del equilibrio gaseoso (Wilson, 2000).



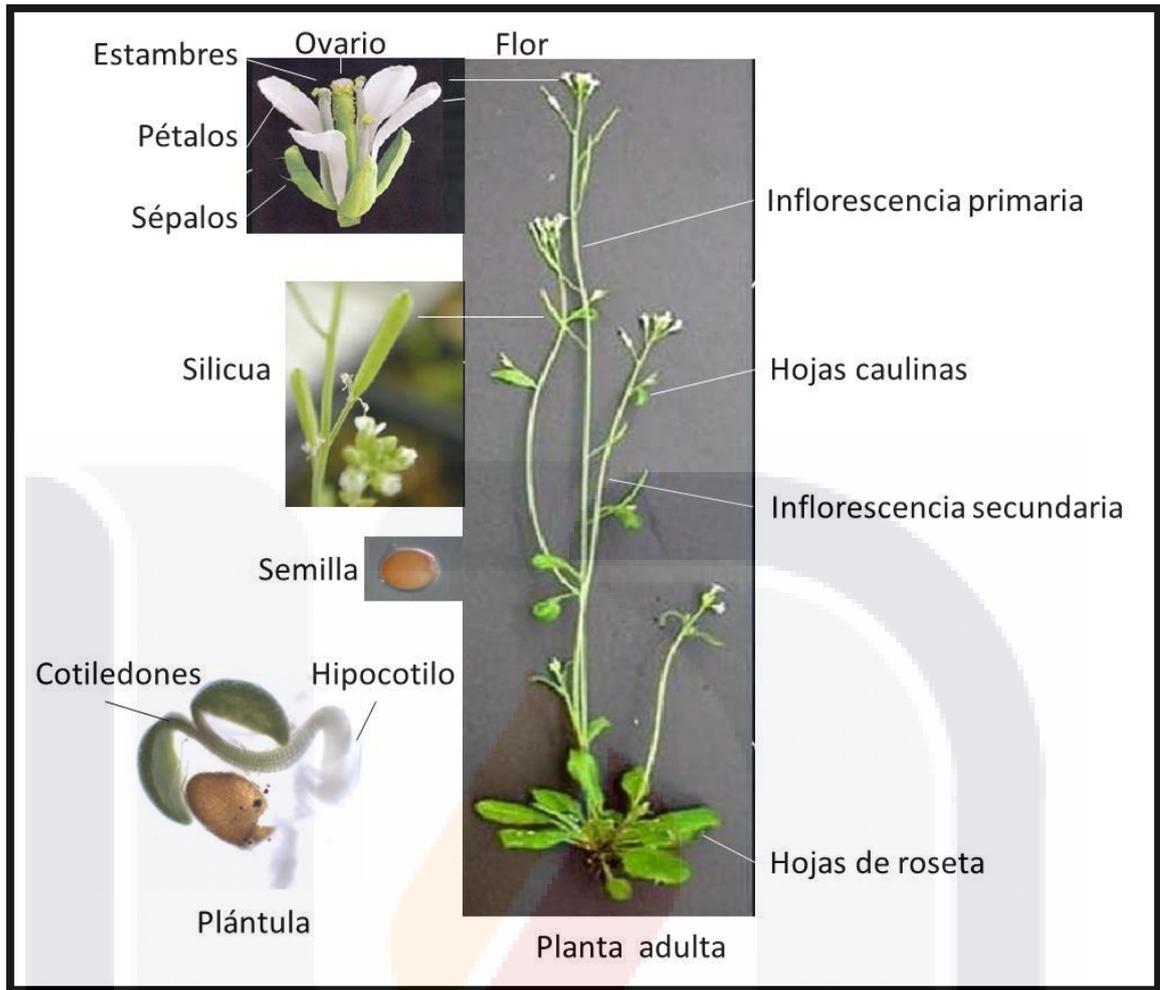


Figura 2. *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* es una planta miembro de la familia de las Brassicaceae. Presenta una forma juvenil llamada plántula, que se observa a partir de dos días después de germinada. La plántula presenta dos cotiledones, un hipocotilo y una raíz primaria cuando es incubada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en fotoperiodos. La planta adulta se desarrolla aproximadamente en 35 días después de germinar en condiciones de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, en fotoperiodos de 20 h, en fotoperiodos más cortos de hasta 6 h, la planta se desarrolla en forma normal, sólo que en más tiempo. La planta adulta desarrolla un grupo de hojas de roseta de entre 2 y 5 cm de diámetro, de las cuales emerge la inflorescencia primaria que puede alcanzar una altura de alrededor de 30 cm. De la inflorescencia primaria se ramifican las inflorescencias secundarias donde se localizan las hojas caulinas y las flores, que tienen unas dimensiones de aproximadamente 3 mm de largo por 1 mm de ancho. Las flores producen 4 sépalos, 4 pétalos, 6 estambres y un ovario. En las inflorescencias se localizan además los frutos o silicuas, que son vainas que contienen entre 30 y 60 semillas cada una. (Wilson 2000).

1.3.2 Cultivo de suspensiones de células vegetales

Los cultivos de suspensiones celulares son células libres desarrollándose en condiciones asépticas y controladas en medio líquido en movimiento. El desarrollo de la suspensión celular es del tipo exponencial, pasa por tres etapas: la fase inicial de latencia, donde el número de células no aumenta; una fase de crecimiento durante el cual el crecimiento constante; y una fase estacionaria durante la cual el número de células no aumenta. Su crecimiento depende de la calidad del medio de cultivo, el medio de cultivo debe renovarse cada semana en la mayoría de los casos; de la presencia de reguladores de crecimiento, la división celular se ve favorecida en presencia de reguladores tipo auxina como el 2, 4 D; de la relación de O_2/CO_2 ; y de las condiciones de luz y oscuridad (Adelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

Los cultivos de células en suspensión son ampliamente usadas en estudios de biología de plantas por ser una herramienta muy conveniente en muchos aspectos. La homogeneidad de los cultivos, la gran cantidad de material vegetal disponible y la reproducibilidad de las condiciones, hace de los cultivos de células vegetales en suspensión muy apropiados para el análisis de diversos procesos a nivel celular y molecular (Mostatiello *et al.*, 2013).

Los estudios toxicológicos en células en suspensión tienen varias ventajas, pero también algunas desventajas, sobre el estudio en plantas completas. La planta completa se compone de células de diversos tipos, organizadas en estratos, de modo que en estudios toxicológicos, durante la exposición a diversas sustancias, el contacto directo se llevará a cabo con las células más superficiales y en menor grado con las capas internas, de manera que la respuesta celular no es homogénea. En los cultivos en suspensión se cuenta con células individuales de un solo tipo, que contienen toda la información que tiene una planta completa y que se distribuyen libremente en el medio de exposición, lo que facilita que todas las células entren en contacto con el tóxico y presenten una respuesta uniforme y un análisis más práctico. Por otro lado, también una ventaja, las condiciones experimentales, como pH, temperatura, nutrientes, oxigenación y espacio, pueden controlarse mejor en un cultivo de células en suspensión que en una planta intacta, sobre todo si la planta es cultivada en medio sólido o suelo (Fig. 3). Además, una única célula puede ser cultivada rápidamente y producir muchas células idénticas, de manera que los resultados de toxicidad pueden obtenerse mucho más rápido que en plantas completas. Una desventaja de los cultivos celulares es que no se encuentran en un ambiente normal y sus actividades

no están reguladas por otras células o tejidos, como ocurre en una planta completa. Además, los cultivos de células en suspensión, constituidas principalmente por células meristemáticas indiferenciadas, son débiles e inestables, y pequeñas variaciones en las condiciones de cultivo, luz, oxigenación, pueden provocar estrés o muerte celular, lo que puede ocasionar que se interpreten de manera inadecuada los resultados de toxicidad. Por otra parte, las células vegetales en suspensión tienden a formar agregados, lo que puede impedir el contacto del tóxico con algunas células (Lodish *et al.*, 2006).

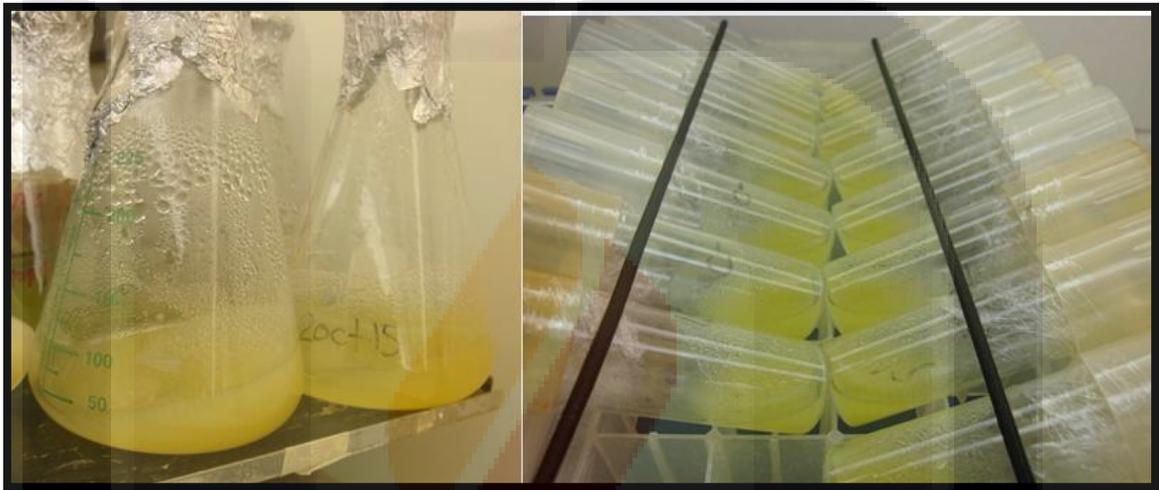


Figura 3. Cultivos de células vegetales en suspensión. Las células vegetales se desarrollan libres en medio líquido en movimiento.

1.4 Biomarcadores

Los biomarcadores son instrumentos de medición de los cambios físicos, bioquímicos o moleculares que presenta un individuo o una población como consecuencia de la exposición a sustancias, y que ayudan a predecir el impacto de los contaminantes en el crecimiento, desarrollo, reproducción o supervivencia de una población. Se pueden realizar estudios de campo en poblaciones nativas que pudieran estar expuestas, para evaluar la presencia de algún tóxico, estimar el grado de toxicidad de alguna sustancia, y evaluar la remoción de los tóxicos en el ecosistema. También pueden hacerse estudios en el laboratorio, haciendo exposiciones de poblaciones de especies conocidas, que pueden ser animales o plantas, como *A. thaliana*, en cultivos estandarizados, bajo condiciones controladas, utilizando concentraciones conocidas de la sustancia a evaluar. Los biomarcadores son parámetros que se evalúan de esas poblaciones que ayudan a valorar la toxicidad rápidamente, también aportan información sobre los mecanismos de toxicidad (Jaramillo *et al.*, 2009). Algunos biomarcadores que pueden ser útiles son: parámetros morfológicos o citológicos, evaluación de los mecanismos de defensa, análisis de expresión genética, cuantificación de sustancias funcionales, evaluación del daño a macromoléculas, análisis enzimático, respuestas inmunológicas, análisis de genotoxicidad (Jaramillo *et al.*, 2009). A continuación se describen con más detalle algunos biomarcadores.

1.4.1 Catalasa

La catalasa es una enzima que ha sido usada exitosamente como biomarcador porque es una activa participante de la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Diversos eventos de estrés propician que las plantas generen una mayor cantidad de EROs, entre los que se cuenta el H_2O_2 . Como ya se mencionó en apartados anteriores, los MNEs de $Ag@TiO_2$ y TiO_2-Cu^{2+} , por su propiedad fotocatalítica y por la presencia de metales, generan EROs. Las plantas responden mediante diversos mecanismos para eliminarlas, que de otro modo producirían daño a diferentes estructuras celulares. La participación de la catalasa es crucial. La catalasa (E. C. 1.11.1.6) participa en la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 para formar agua y O_2 . En eucariontes, la enzima está organizada en tetrámeros, donde cada monómero tiene un grupo hemo, que participan en la reducción del H_2O_2 rompiendo el enlace O-O para formar una molécula de agua, un intermediario oxi-ferril (compuesto I)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y un radical de porfirina; posteriormente, una segunda molécula de H_2O_2 es oxidada para liberar O_2 y reducir el compuesto I a su estado inicial (Fig. 4). En *A. thaliana*, al igual que otras plantas, tiene tres genes que codifican para esta enzima *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* y que se expresan de manera diferencial: *CAT1* se expresa en polen y semillas, *CAT2* en hojas, raíz y semillas, mientras que *CAT3* en hojas y tejido vascular (Mhamdi *et al.*, 2010).

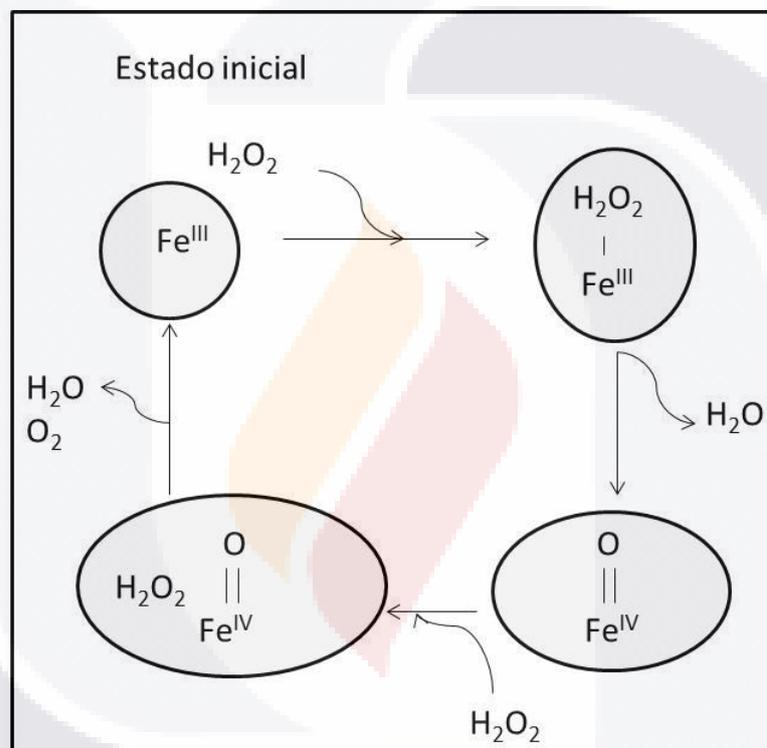


Figura 4. Esquema de reacción óxido-reducción de la catalasa. Los números romanos indican el estado de oxidación del hierro del grupo hemo de la catalasa (Modificado de Mhamdi *et al.*, 2010).

1.4.2 Ascorbato peroxidasa

La exposición de plantas a condiciones desfavorables incrementa la producción de EROs, y el proceso de destoxificación es esencial para la protección de las células y sus organelos. La ascorbato peroxidasa (APX) (E. C. 1.11.1.11) es una de las principales enzimas encargadas de la destoxificación del H_2O_2 . APX utiliza ascorbato como donador de electrones para reducir el H_2O_2 a agua (Fig. 5). En *A. thaliana* se han encontrado 9 genes que codifican para APX, que se expresan en cloroplastos, citoplasma, peroxisomas y mitocondrias (Caverzan *et al.*, 2012).

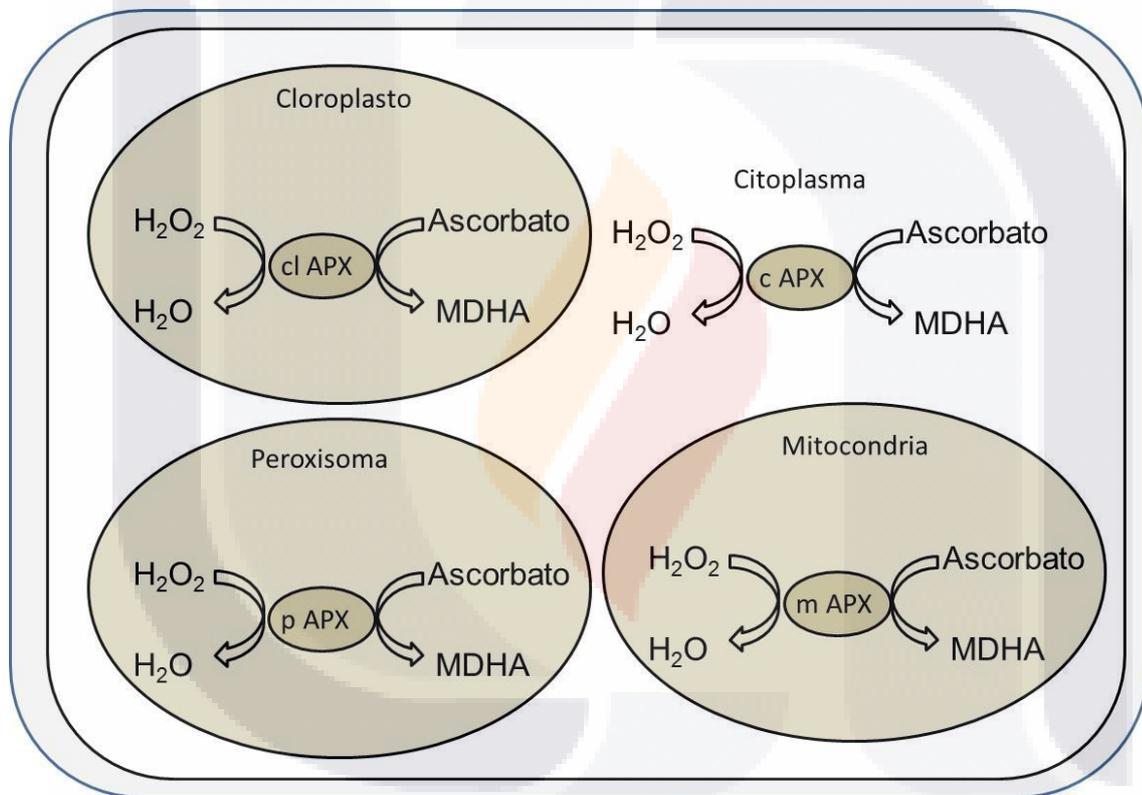


Figura 5. Actividad de ascorbato peroxidasa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es generado durante el metabolismo y en diversas condiciones de estrés, la célula produce la enzima ascorbato peroxidasa (APX) que cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O , utilizando como donador de electrones al ascorbato que es convertido a monodehidroascorbato (MDHA). Ante un incremento de H_2O_2 aumenta la síntesis de esta enzima y se produce una isoforma específica en cloroplasto (cl APX), peroxisoma (p APX), citoplasma (c APX), mitocondria (m APX) (Modificado de Caverzan *et al.*, 2012).

1.4.3 Superóxido dismutasa

En las células vegetales el radical superóxido ($\bullet\text{O}_2$) es producido durante los eventos fotosintético y respiratorio, pero también en diferentes tipos de estrés. Los niveles de $\bullet\text{O}_2$ deben mantenerse bajo control. La superóxido dismutasa SOD (E. C. 1.15.1.1) cataliza la conversión de este radical para convertirlo en H_2O_2 y O_2 (Fig. 6). Las SODs son clasificadas de acuerdo al metal que utilizan como cofactor, que puede ser manganeso (MnSOD), hierro (FeSOD) y cobre/zinc (CuZnSOD). *A. thaliana* cuenta con 7 isoformas de SOD: una MnSOD de ubicación mitocondrial; tres FeSOD, dos localizadas en cloroplastos y una en citoplasma; y tres CuZnSOD, una localizada en citoplasma, otra en peroxisomas y la otra en cloroplastos (Alscher *et al.*, 2002) (Fig. 6).

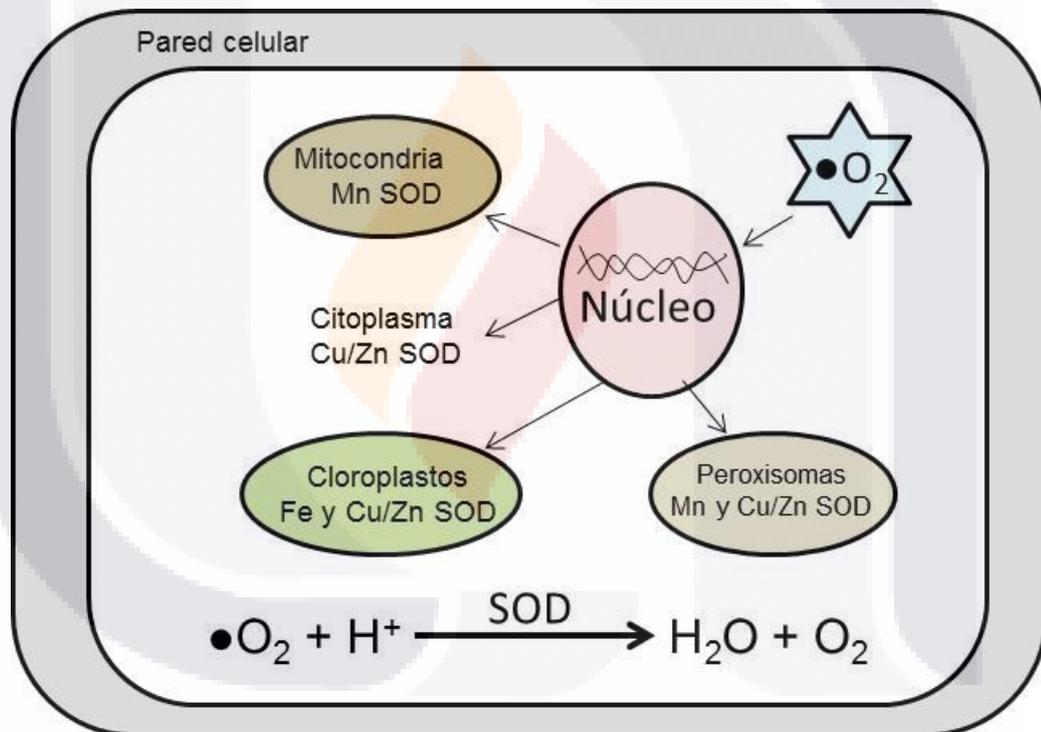


Figura 6. Distribución de las superóxido dismutasas en la célula vegetal. El radical superóxido ($\bullet\text{O}_2$) induce la expresión de genes de superóxido dismutasa (Basado en Alscher *et al.*, 2002).

1.4.4 Antocianinas

Las antocianinas son flavonoides que le confieren coloración rojiza a las plantas. Una elevada concentración de EROs puede desencadenar un complejo mecanismo antioxidante en las plantas, que tanto pueden ser enzimáticos (APX, catalasa, SOD) como no-enzimáticas, entre los que se cuentan las antocianinas. Diferentes condiciones estimulan la ruta de síntesis de las antocianinas, aumentando la probabilidad de supervivencia de la planta: la luz, con lo que al parecer se incrementa la resistencia a la radiación UV de onda larga; la deficiencia de nitrógeno, fósforo o azufre; las bajas temperaturas; un aumento en la cantidad de EROs, participando en su secuestro (Salisbury & Ross, 1994). *A. thaliana* genera alrededor de 20 antocianinas que se producen diferencialmente en respuesta a distintas condiciones de estrés. Se ha reportado que las antocianinas A11, A9, A8 y A5 son inducidas en respuesta a estrés por sequía, o por exceso de $MgSO_4$; y que la A11 se expresa más en presencia de EROs (Kovinich *et al.*, 2015).

1.4.5 Clorofila

Los pigmentos verdes presentes en los tilacoides son dos tipos de clorofilas: *a* y *b*. Son pigmentos fotosintéticos. Cuando la clorofila *a* absorbe un fotón de luz de longitud de onda de 680 nm, incrementa su energía. Esta molécula excitada, dona un electrón a una molécula aceptora, la quinona Q, para convertirse en Q^- , que tiende a donar un electrón a la molécula de $NADP^+$. A su vez la molécula de clorofila *a* oxidada, acepta un electrón del agua para regresar a su estado original. Estas moléculas reductoras y oxidantes, participan en las reacciones subsiguientes de la fotosíntesis: transporte de electrones, síntesis de ATP y fijación del CO_2 (Lodish *et al.*, 2006). Durante la fotosíntesis, la energía luminosa es convertida en energía química, siendo fundamental la participación de la clorofila *a*. Cuantificar el contenido de clorofila en las plantas es un parámetro muy útil para evaluar el estado fisiológico de las plantas, y para monitorear el impacto que producen en la planta distintas condiciones ambientales, ya que en situaciones de estrés tiende a disminuir su síntesis (Queiroz *et al.*, 2016).

1.4.6 Expansinas

Las expansinas son proteínas que se encuentran en la pared celular vegetal. La pared celular determina la forma y tamaño a través de un control mecánico, es una barrera protectora compuesta por microfibrillas de celulosa y de otros polisacáridos como xiloglucanos, glucuronoarabinoxilanos y/o β -D-glucanos embebidos en una matriz de pectina. La pared celular primaria se divide para permitir la elongación, mientras que la pared secundaria se deposita sobre la primaria engrosándola. Varias proteínas actúan en los componentes de la pared celular, modulando el alargamiento y expansión de las plantas, entre las que se encuentran las expansinas (Le Gall *et al.*, 2015). Las expansinas actúan rompiendo los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las cadenas de polisacáridos, principalmente celulosa y hemicelulosa, sin hidrolizarlas (Fig. 7). Esta acción está involucrada con el crecimiento celular y la maduración del fruto. Son las únicas proteínas que producen una relajación de la estructura de la pared celular vegetal y permiten la incorporación de subunidades a los polímeros, dándose una extensión (Cosgrove, 1999). Varias condiciones de estrés modifican el crecimiento de las plantas y/o el grosor de la pared celular, ya que su arquitectura es importante en la resistencia al estrés abiótico (Le Gall *et al.*, 2015).

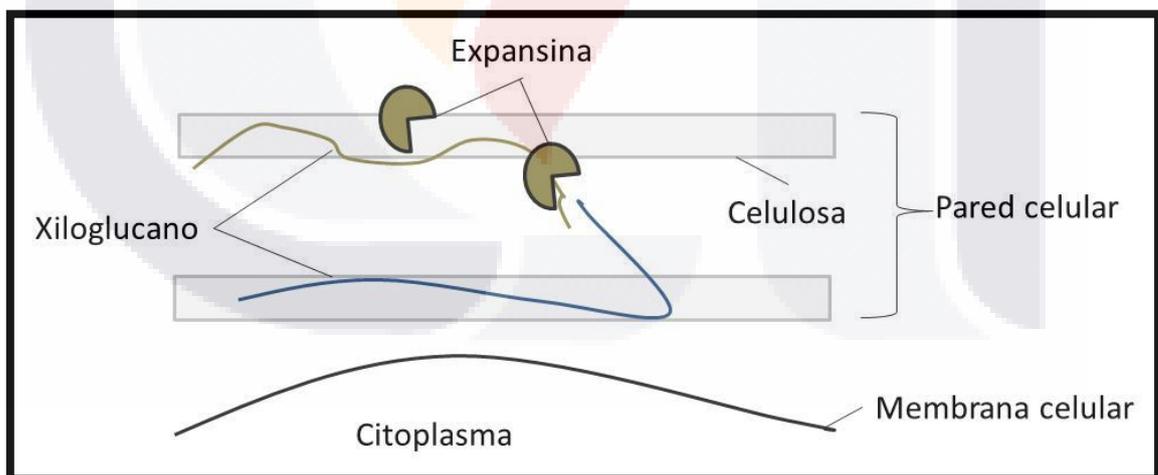


Figura 7. Modelo de acción de las expansinas. Las expansinas son proteínas que actúan rompiendo los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las cadenas de polisacáridos, celulosa y hemicelulosa, componentes de la pared celular vegetal, sin hidrolizarlas, lo que permite la incorporación de subunidades a los polímeros, para promover la extensión (Basado en Cosgrove, 1999).

1.4.7 Etileno

El etileno es una fitohormona relacionada con diversos eventos del desarrollo y de procesos de estrés en plantas. El etileno inhibe el alargamiento de tallos y raíces, y provoca engrosamiento que ayuda a la planta a sobrevivir cuando emerge de la tierra. Esto se ha observado en dicotiledóneas como chícharo y *A. thaliana*. En esas especies, se forma un gancho en el hipocotilo, también como respuesta al etileno, que ayuda a la planta a abrirse espacio para atravesar la tierra manteniendo a salvo los cotiledones (Salisbury & Ross 1994). El etileno se sintetiza a partir de la metionina que entra en una serie de reacciones enzimáticas conocidas como el ciclo de Yang, para producir el S-adenosilmetionina y el ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que por acción de la ACCsintasa produce el etileno (Fig. 8). Diversos estímulos bióticos y abióticos pueden estimular la síntesis de etileno (Guzmán & Ecker 1990).

La respuesta del etileno es mediada por una familia de receptores localizados en la membrana del retículo endoplásmico. En *A. thaliana* se han identificado cinco receptores llamados de respuesta a etileno ETR1 y ETR2; de respuesta sensorial a etileno ERS1, ERS2 y EIN4. En la señalización del etileno participan cuatro componentes: el receptor ETR1, el regulador negativo de la ruta CTR1, el intermediario EIN2 y el factor de transcripción EIN3 (Fig. 9). El etileno estimula la transcripción de diversos genes nucleares. Existen algunas moléculas que antagonizan la acción del etileno, por ejemplo el CO₂, que provoca una menor producción de esta hormona (Salisbury & Ross, 1994); ion plata Ag⁺, que compete con el cobre en los receptores, impidiendo la asociación del etileno (Bakshi *et al.* 2015) (Fig. 10c).

El etileno estimula la abscisión de las hojas; acelera la maduración de frutos promoviendo la pérdida de clorofila y el desgaste de las paredes celulares. El etileno aumenta su propia producción. El etileno participa en la senescencia de la flor, facilita el desprendimiento de los pétalos, los floricultores suelen sumergir los tallos cortados en solución de tiosulfato de plata, considerando que la plata antagoniza su efecto, prolongando el tiempo de vida de las flores. El gancho apical que protege al ápice de vástago mientras el tallo crece a través del suelo, se mantiene gracias al etileno. El etileno limita la elongación del tallo tanto en condiciones de luz como de oscuridad. En conjunto, estos fenómenos constituyen la *respuesta triple* al etileno (Sadava *et al.*, 2009). Induce mecanismos de respuesta en la planta ante ataque de hongos. (Salisbury & Ross, 1994).

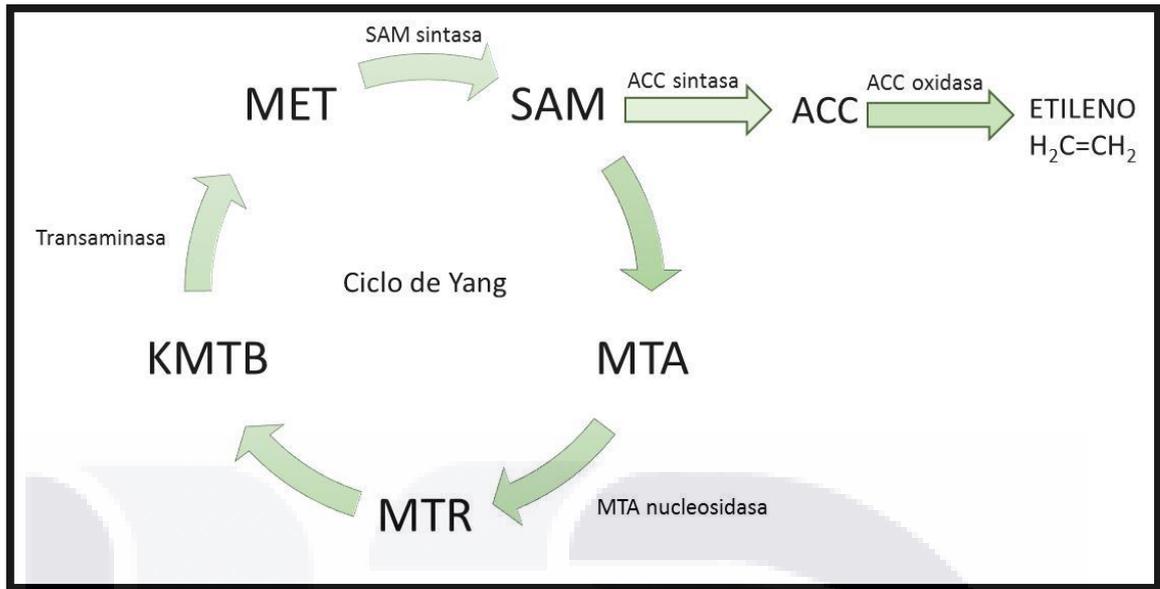


Figura 8. Ruta de formación del etileno. Representación esquemática del ciclo de Yang y de la ruta biosintética del etileno. ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; KMTB, ácido 2-ceto-4-metiltiobarbitúrico; MTA, 5' metiltioadenosina; MTR, 5' metiltiorribosa; SAM, S-adenosilmetionina (Basado en Salisbury & Ross, 1994).

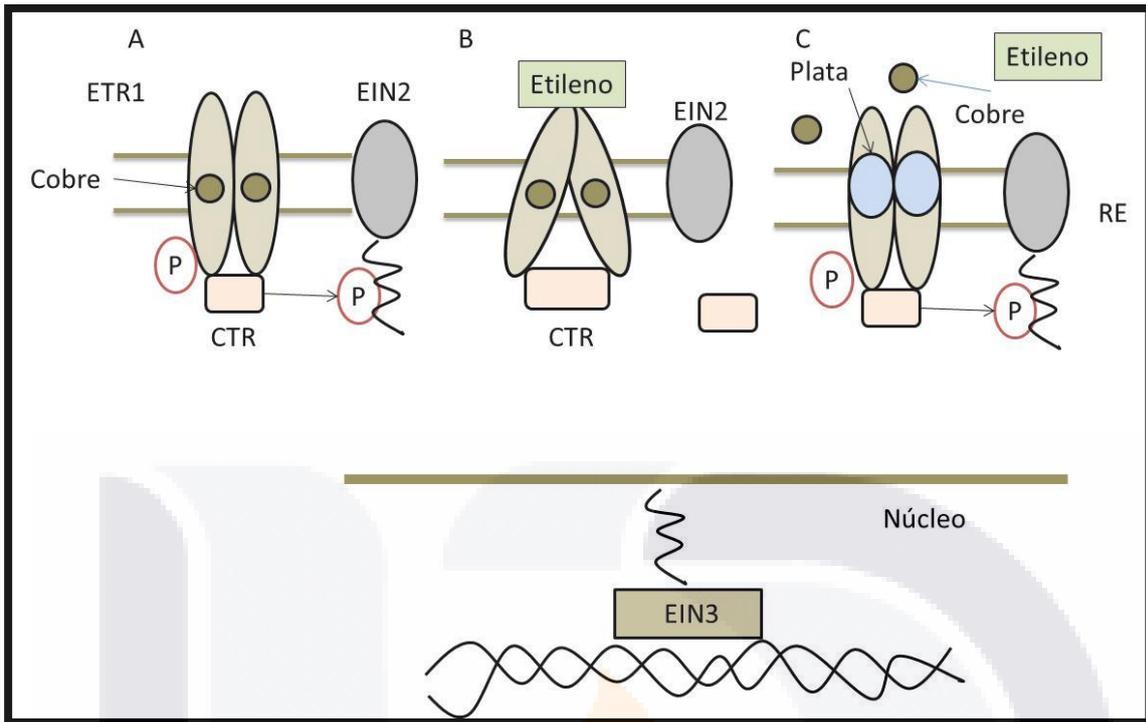


Figura 9. Modelo de acción del etileno. (A) Receptor ETR1 en ausencia de etileno. (B) Receptor ETR1 activado por etileno, inactiva a CTR, evitando la fosforilación de EIN2, lo que favorece la liberación del extremo carboxilo que viaja al interior del núcleo, activando al factor de transcripción EIN3 para que participe en la expresión de genes de respuesta a etileno. (C) En presencia de plata desplaza al cofactor cobre y al etileno, evitando la respuesta (Basado en Bakshi *et al.*, 2015).

1.4.7.1 Mutantes de etileno

Los investigadores han aislado varias mutantes de *A. thaliana* afectadas en alguno de los intermediarios que conforman la señalización del etileno, después de tratar las semillas a mutágenos como el etil metano sulfonato, para conocer la manera en que están involucrados. Las mutantes de *A. thaliana* fueron aisladas considerando el fenotipo alterado de plántulas crecida en la oscuridad, la llamada triple respuesta producida por el etileno en la cepa silvestre: raíces e hipocotilos cortos y gruesos, la formación del gancho apical y ausencia de percepción geotrópica (Guzmán & Ecker, 1990). Las mutantes pueden hacer a la planta insensible o de respuesta constitutiva (Salisbury & Ross, 1994). Entre las mutantes insensibles se cuenta con la *etr1-1* con menor afinidad del etileno por el receptor ETR1 (Bleecker *et al.*, 1988); la *ein 2-1* modificada en la proteína intermediaria EIN2 (Guzmán & Ecker, 1990); y la *ein 3-1* que tienen alteraciones en el factor de transcripción EIN3 (Kieber *et al.*, 1993). Las mutantes insensibles carecen de varias respuestas al etileno presentes en plantas silvestres, entre las que se cuentan la inhibición del alargamiento de raíz e hipocotilos (Fig. 10), menor contenido de clorofila en las hojas, y mayor germinación de semillas (Salisbury & Ross, 1994).

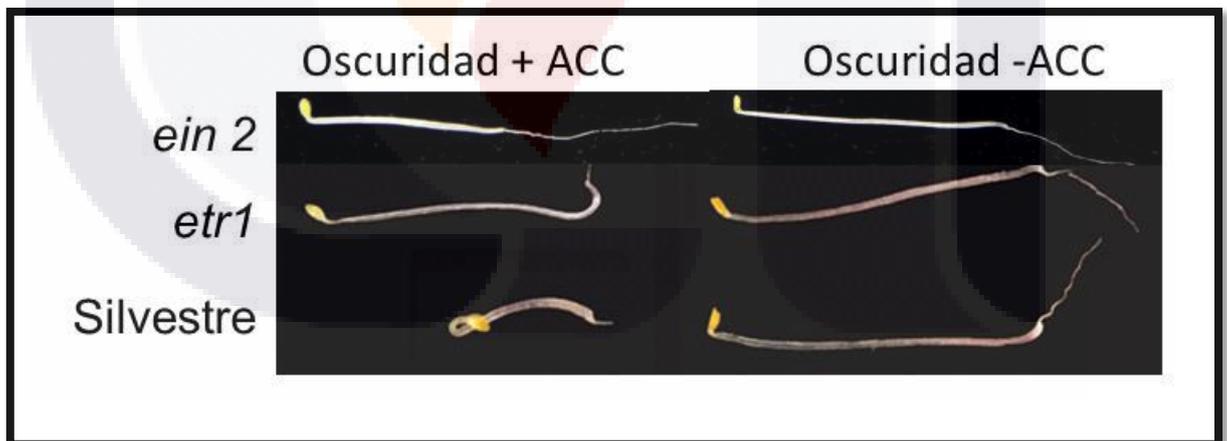


Figura 10. Mutantes insensibles a etileno y silvestre de *A. thaliana*. Crecimiento de las mutantes *ein 2* y *etr1* y de la silvestre en la oscuridad, en presencia y ausencia de ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del etileno.

1.4.8 Proteínas LEA

Las proteínas LEA, siglas de su nombre en inglés Late Embryogenesis Abundant (abundantes en la embiogénesis tardía), están involucradas en la protección de plantas superiores del daño causado por estrés ambiental, especialmente por deshidratación o frío. En *A. thaliana* se han identificado 51 proteínas LEA clasificadas de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. Entre las funciones de las proteínas LEA se incluyen su papel antioxidante y de estabilización de la membrana durante el estrés hídrico (Tunnacliffe & Wise, 2007).

1.5 Antecedentes de materiales nanoestructurados antimicrobianos

Algunos MNEs se están utilizando como desinfectantes o en la purificación de agua contaminada con microorganismos o sustancias orgánicas, con la ventaja sobre desinfectantes de uso cotidiano, de no producir compuestos potencialmente riesgosos para la salud al entrar en contacto con el agua. El mecanismo de acción de los MNEs contra los microorganismos depende de las características de composición y estructura de los mismos (Seil & Webster, 2012).

En el caso de los MNEs de TiO_2 , por sus propiedades fotocatalíticas, generan especies reactivas de oxígeno (Fig. 1). Los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), superóxido ($\bullet\text{O}_2$) y peróxido (H_2O_2) son especies reactivas de oxígeno (EROs) que pueden interactuar con macromoléculas celulares, sobre todo con aquellas que presentan insaturaciones (dobles y/o triples enlaces), lo que las hace más susceptibles a la degradación enzimática o las convierte en radicales libres orgánicos. Los lípidos por acción de $\bullet\text{OH}$ y en presencia de O_2 , forman radicales peróxido lipídicos y malondialdehído (MDA). El MDA puede unirse a proteínas y al DNA causando muerte celular. Las proteínas atacadas por el $\bullet\text{OH}$, principalmente en los aminoácidos prolina, histidina, arginina, cisteína y metionina, provoca fragmentación, entrecruzamiento y agregación, lo que induce una mayor velocidad de digestión por proteasas. El DNA también se ve afectado, pudiendo generarse mutaciones; el DNA mitocondrial es más sensible que el DNA nuclear, ya que este último está protegido por histonas (Pan *et al.*, 2010). Los de los microorganismos son especialmente susceptibles, de modo que los MNEs de TiO_2 , puede matar bacterias (Ammendiola *et al.*, 2014), protozoarios y virus (Liga *et al.*, 2013). Los MNEs de TiO_2 , gracias a su propiedad fotocatalítica, han encontrado una diversidad de aplicaciones que incluyen purificación de aire y de agua, para eliminar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contaminantes orgánicos; en celdas solares como material fotoactivo; en la desinfección de superficies; en la limpieza de vidrios y de textiles; en medicina está siendo evaluada su aplicación en el tratamiento de acné, de condiloma acuminado, dermatitis atópica, hiperpigmentación de piel (Shi *et al.*, 2013).

El dopaje de MNEs de TiO₂ con metales, proporciona propiedades diferentes a las que presentan los MNEs de TiO₂ puros, porque se reduce la banda prohibida y la actividad fotocatalítica se produce en el espectro de la luz visible, a diferencia de los MNEs de TiO₂ que se activan por radiación UV (Pan *et al.*, 2010. Medina-Ramírez *et al.*, 2011). Esto puede representar una ventaja si se aplica luz solar, ya que sólo el 5% es luz UV, mientras que el 45% es luz visible (Akhavan, 2009). Los metales también producen daño a la célula microbiana, al interactuar con pared celular, DNA, enzimas y proteínas de membrana y también generar EROs (Eckhardt *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2010). Este daño puede ser ocasionado tanto por metales esenciales como no esenciales. Por ejemplo, el cobre que es requerido para el funcionamiento de enzimas tales como la citocromo c oxidasa y la superóxido dismutasa, se conoce que puede llevar a cabo reacción tipo Fenton para producir radical •OH altamente tóxico, o puede reaccionar con proteínas que contienen radical sulfhidrilo y producir H₂O₂, o desplazar a otros metales de su asociación en proteínas inactivándolas (Grass *et al.*, 2011). Los MNEs de TiO₂ dopados con metales tienen propiedades antimicrobianas por el sinergismo de las actividades del TiO₂ y del metal (Fig. 11). En la Tabla 2 se destacan las características de algunos MNEs de TiO₂ que han sido estudiados por su actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana depende también de otros factores: la proporción de las formas cristalinas del TiO₂, anatasa, rutilo y broquita y la relación molar entre el TiO₂ y el metal (Gupta *et al.*, 2013); el protocolo y reactivos de síntesis, así como las dimensiones de las partículas (Giannousi *et al.*, 2014). La desinfección de instrumental clínico, de agua y de alimentos es muy importante para el control de microorganismos patógenos. Por siglos se han empleado agentes como alcoholes, aldehídos, yodo, fenoles y cloro, con una alta eficiencia, sin embargo, estos compuestos son volátiles y generan subproductos que pueden ser muy tóxicos. El uso de MNEs de TiO₂ y sus derivados son una alternativa real para esta aplicaciones (Liou y Chang, 2012).

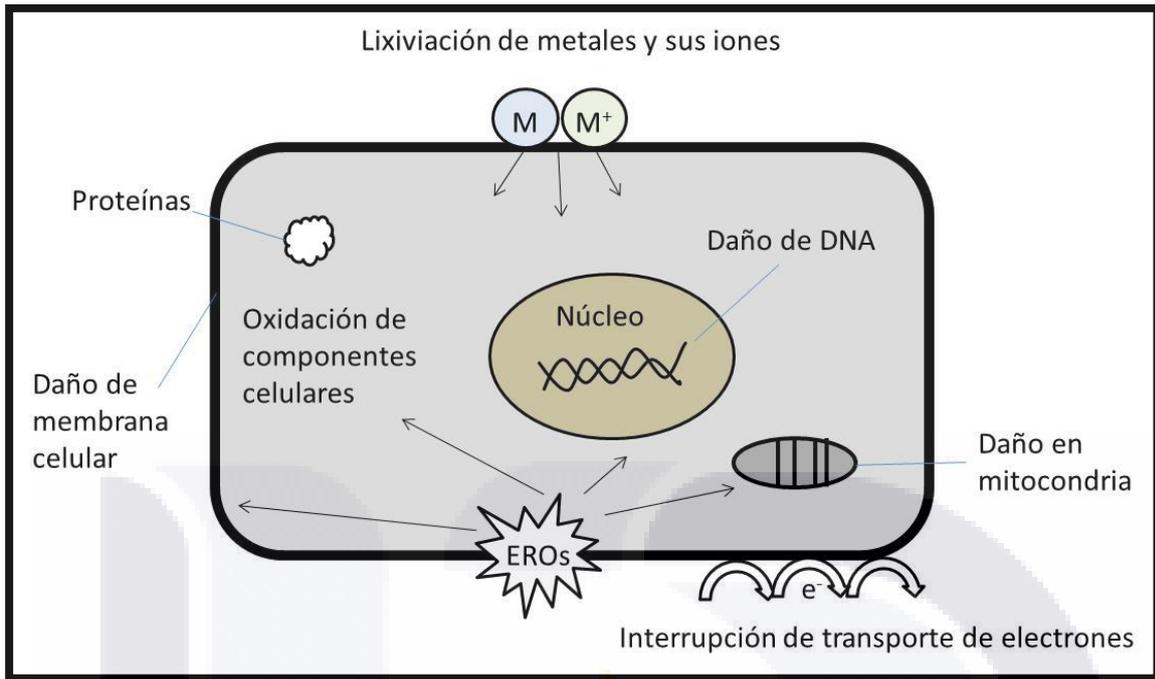


Figura 11. Mecanismos de toxicidad de materiales nanoestructurados de dióxido de titanio dopado con metales. Los MNEs de TiO_2 y los metales (M) o sus iones (M^+), pueden producir especies reactivas de oxígeno con el consecuente daño a estructuras de la célula bacteriana, dando como resultado muerte celular (Basado en Hajipour *et al.*, 2012).

Tabla 2 Elaborada por Garcidueñas-Piña (2016).

Tabla 2. Propiedades antimicrobianas de materiales nanoestructurados de TiO ₂				
MNEs	Características	Microorganismos evaluados	Actividad antimicrobiana	Referencia
TiO ₂	11 nm anatasa	<i>Escherichia coli</i>	17 mg/L	Lin <i>et al.</i> , 2014
	26 nm anatasa		59 mg/L	
	27 nm anatasa/rutilo		163 mg/L	
	57 nm anatasa		304 mg/L	
	57 nm rutilo		No activa	
	40 nm	<i>Listeria monocytogenes</i>	24 h No activa	Ammendolia <i>et al.</i> , 2014
	32.58 nm	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i>	20 µg/ml En placa	Santhoshkumar <i>et al.</i> , 2014
TiO ₂ -Ag	18 y 16 nm Anatasa	<i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	1.3 -2 mg/ml 4 h	Gupta <i>et al.</i> , 2013
	20-50 nm Anatasa/rutilo	<i>E. coli</i>	0.5 mg/ml Toda la noche	Pan <i>et al.</i> , 2010
	Película 30 nm de espesor	<i>E. coli</i>	2-3 h	Akhavan <i>et al.</i> , 2009
	Placa de aluminio recubierta del MNE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15 -40 min	Li <i>et al.</i> , 2008
TiO ₂ -Cu	20 nm Forma cristalina no especificada. 0.6 y 1.8% Cu	<i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Shewanella oneidensis</i>	0.02 mg/L 24 h Inhibe reproducción	Wu <i>et al.</i> , 2010
Ag(C, S)TiO ₂	10 nm	<i>E. coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>	25mg/ml	Hamal <i>et al.</i> , 2009
TiO ₂ ZnO	Nanotubos 70 nm X 2µm	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	1.7 a 2.7 d	Liu <i>et al.</i> , 2015
SiO ₂ /TiO ₂ N/SiO ₂ /TiO ₂	Películas 17.2 nm 9.2 nm	<i>E. coli</i> <i>Salmonella typhi</i>	30 min 15 min	Kongsong <i>et al.</i> , 2014

1.6 Antecedentes de efectos en plantas expuestas a materiales nanoestructurados

Diversos estudios han sido realizados para investigar la respuesta de las plantas a la presencia de los MNEs; en la tabla 3 se muestran algunas características de reportes recientes. Los MNEs pueden influir en el desarrollo de las plantas, y evidentemente la composición de estos determina el grado de afectación. Landa *et al.* (2013), evaluaron los efectos de MNEs de ZnO, fulerenos y TiO₂ en *A. thaliana*, y reportaron que los MNEs de ZnO inducen una mayor expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés que los otros dos, con lo que suponen una mayor toxicidad de este material. Sin embargo, las características particulares de los materiales, pueden establecer el grado de afectación que generan en una planta, aunque tengan la misma composición. Syu *et al.* (2014) evaluaron los aspectos como alargamiento de raíz y acumulación de enzimas en *A. thaliana* expuesta a MNEs de Ag de tres diferentes formas y tamaños, y reportaron que las decahédricas (45 ± 5 nm), triangulares (47 ± 7) provocan un mayor alargamiento de la raíz que las esféricas (8 ± 2 nm). También encontraron diferencias en otros aspectos como acumulación de enzimas y de otras proteínas, es decir, que materiales de la misma composición pero de diferente tamaño y forma pueden producir efectos diferentes.

Se ha observado que los efectos de la exposición a MNEs en plantas, dependen también de la especie analizada, siendo algunas más sensibles que otras. Yin *et al.* (2012) reportan que al evaluar MNEs de Ag en once especies de plantas acuáticas, encontraron estimulación de la germinación en una especie, inhibición en tres y ningún efecto en siete. Por su parte, Josko & Oleszczuk (2014), encontraron que el propio método de análisis de los efectos de MNEs en plantas puede influir en los resultados; ellos evaluaron dos protocolos en medio líquido y dos en medio sólido, consiguiendo efectos desde ligeramente diferentes hasta contradictorios. Esos reportes pueden ser inquietantes, ya que pareciera que no hay una conclusión única, y tal vez para tener una mejor idea del impacto real de un determinado MNE, debe considerarse evaluar sus efectos en varias especies de plantas y por más de un método de exposición.

Entre los aspectos físicos que más han sido analizados están la germinación; la elongación y forma de la raíz; número de hojas, producción de frutos y flores y viabilidad de células. Song *et al.* (2013) hicieron un estudio comparativo de los efectos producidos en *L. esculentum* por exposición a MNEs de TiO₂ y de Ag, y reportaron que ninguno de los dos afectó la germinación, posiblemente porque la cutícula de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

semilla sirve de filtro, impidiendo el ingreso de los MNEs; sin embargo, en las plántulas expuestas, observaron que con los de TiO_2 no se producen cambios en el desarrollo posterior, mientras que con los de Ag hay una inhibición en el crecimiento a medida que se incrementó la concentración aplicada (Song *et al.*, 2013).

Sin embargo, hay otros trabajos en los que se reporta un mayor porcentaje de germinación, de alargamiento del tallo y raíz, y unos frutos más grandes, como Kumar *et al.* (2013) con MNEs de Au en *A. thaliana*, argumentando que los MNEs facilitan la entrada de agua a la planta, aunque no hacen ninguna comprobación experimental. Por su parte, otros investigadores han propuesto que el mayor alargamiento de la plántula puede ser estimulada por EROs que inducen genes relacionados con la división celular (Syu *et al.*, 2014) o que producen un ablandamiento en la pared celular, como lo reportan Kim *et al.* (2014) que al exponer plántulas de *A. thaliana* a MNEs de Fe^0 observaron una degradación de los polisacáridos de la pared celular (Fig. 3). Aunque se conoce parte del mecanismo de los MNEs por el cual pueden generar cambios físicos en las plantas, las conclusiones han sido más bien especulativas, por lo que se hace indispensable seguir investigando al respecto.

Los estudios bioquímicos se han realizado con dos objetivos principales: uno es el de establecer parámetros o marcadores que ayuden a determinar el grado en que la planta está siendo afectada por la presencia de los MNEs; y el otro, con el fin de entender los mecanismos por los que se producen determinados efectos físicos. Se han realizado mediciones del contenido de clorofila, o de antocianinas, o variaciones en actividad de superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa, entre otros. Zhao *et al.* (2012) observaron en plantas de maíz (*Zea mays*) expuestas a MNEs de CeO_2 , una acumulación de H_2O_2 en la planta, una mayor actividad de las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa, aparentemente como un mecanismo de defensa a la presencia de este material. Por su parte, Nair & Chung (2014 b) al estudiar los efectos de MNEs de Ag en arroz (*Oriza sativa*), atribuyen la menor cantidad de clorofila, a la disminución de la biomasa o a la peroxidación de lípidos de membranas de cloroplastos por las EROs. A continuación se describen algunas características bioquímicas que han sido analizadas en este trabajo.

Varios investigadores han estudiado la persistencia de los MNEs en la superficie o en el interior de las plantas expuestas (Ma *et al.*, 2010). Para que los MNEs sean introducidos a la planta pueden hacerlo por varias vías: (a) atravesar la pared celular, (b) pasar entre las células del parénquima de empalizada, (c) utilizar aberturas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

naturales como los estomas o (d) por fagocitosis (Dietz & Herth, 2011). La fijación de los MNEs o su introducción a la planta, depende del tamaño y de las propiedades de los MNEs (Miralles *et al.*, 2012 a). Estudios han revelado que los MNEs se adsorben en su superficie y después pueden ser trasportadas al interior. Las características lipofílicas de la superficie de los brotes y estructuras como los tricomas facilita la asociación de MNEs con la superficie de la planta. Zhou *et al.* (2011) reportan que al exponer plantas de trigo a MNEs de CuO, de 55 nm, parte de las nanopartículas se adhieren a la superficie mecánicamente, ya que al hacer lavados con Na₂EDTA y ultrasonido, los MNEs son encontrados en la solución. Estos investigadores suponen que el material que persiste en la planta después de los lavados, fue introducido, aunque no muestran otras evidencias. Nair & Chung (2014 a) en *A. thaliana* con MNEs de Ag encuentran una alta concentración de Ag en la planta, más que las expuestas a iones metálicos. Estos investigadores declaran que hacen falta estudios para averiguar si los MNEs se adhieren en la superficie de la planta y desde ahí liberan los iones plata que ingresan más fácilmente, o si ingresan como MNEs intactos.

Para entrar en contacto con el protoplasto, los MNEs deben atravesar la pared celular, cuyos poros son de tamaño limitante, entre 3.5 y 3.8 nm en la raíz y de hasta 20 nm en otras partes de la planta, lo cual sugiere que sólo partículas de menos de 20 nm son capaces de entrar. Aunque se supone que pueden penetrar a través de estructuras como las estomas, que en algunas plantas llegan a ser de 10 µm de diámetro (Fig. 12). La acumulación, persistencia e impacto de los MNEs en el metabolismo y desarrollo de plantas depende del tamaño, concentración y composición química, así como de la parte de la planta en que son depositadas (Dietz & Herth, 2011). En estudio realizado por Larue *et al.* (2012), encontraron que plántulas de trigo expuestas a MNEs de TiO₂ de 36 nm son localizados en el interior de plantas de trigo, aunque sean de mayor tamaño que los poros de la pared celular. La explicación que proponen estos investigadores es que los MNEs de TiO₂ generan EROs que provocan ablandamiento de la pared celular, además, sus evaluaciones las realizan en medio líquido, lo que supone un estrés hipoosmótico para la planta, que va a repercutir también en la rigidez de la pared celular, haciendo que se generen poros de hasta 40 nm. Las EROs también podrían ser responsables de ampliar el rango de acceso a través de la banda Caspariana, que permite el acceso de los MNEs hasta el xilema para alcanzar las hoja.

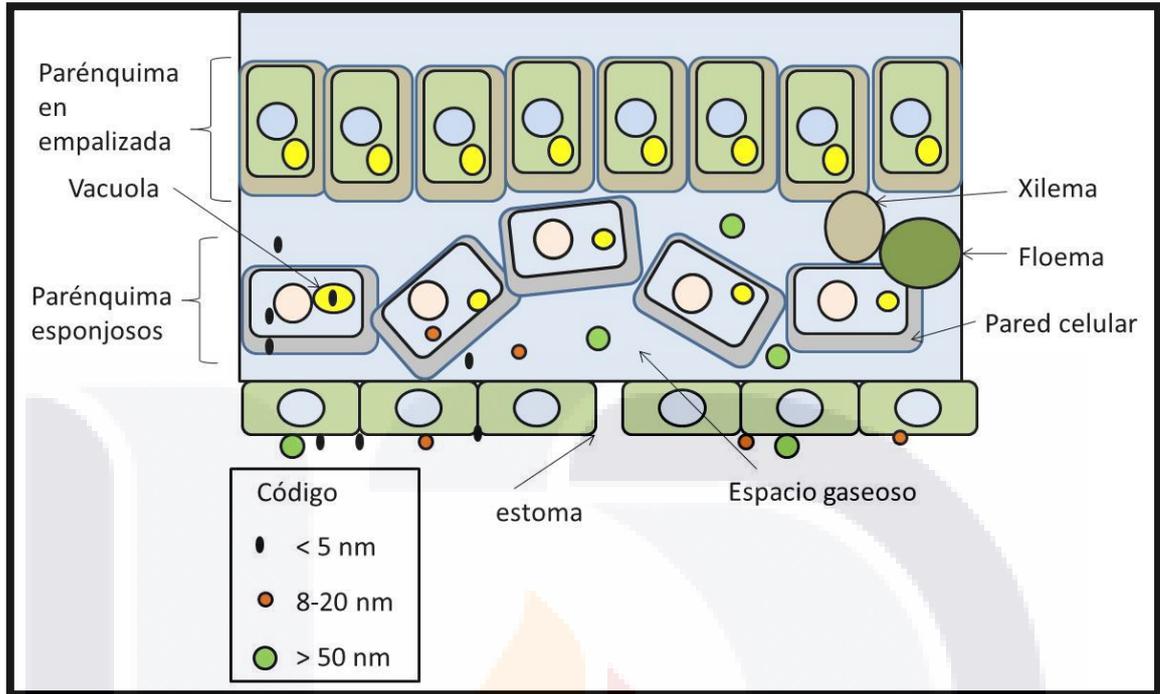


Figura 12. Modelo de ingreso de los materiales nanoestructurados a la planta (basado en Dietz & Herth, 2011).

Tabla 3 Elaborada por Garcidueñas-Piña (2016).

Tabla 3. Efectos observados en plantas por exposición a diferentes materiales nanoestructurados		
MNEs / Plantas	Efecto observado	Referencia
TiO ₂ /Al(OH) ₃ /polidimetilsiloxano 50 nm <i>Vicia faba</i>	No se observaron cambios en el desarrollo de la planta. En raíz disminuyó la actividad de las enzimas glutatión reductasa y ascorbato peroxidasa. Se detectó Ti en el interior de la raíz.	et Foltete al., 2011.
TiO ₂ anatasa rutilo 80:20, 27 nm Ag 10 a 15 nm <i>Lycopersicon esculentum</i>	TiO ₂ aumentó la actividad de la enzima superóxido dismutasa, pero no observaron efecto en germinación, longitud de raíz, capacidad antioxidante ni cantidad de clorofila. Con las de Ag, se vio afectado todo lo anterior y disminuyó la producción de frutos.	et al., Song et al., 2013
TiO ₂ 5 nm Ag 20 nm ZnO 20 nm CdTe/CdS 6-10 nm <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ZnO produjo un aumento de transcrito de genes relacionados con estrés. TiO ₂ un decremento de transcripción de genes relacionados con la fotosíntesis. Ag indujo genes relacionados con la pared celular.	Simon et al., 2013
TiO ₂ 21 nm ZnO menor 100 nm Anatase:rutilo 80:20 Fullereno C ₆₀ 76%, C ₇₀ 22% <i>A. thaliana</i>	Microarreglos: ZnO y Fullerenos indujeron genes conocidos como de respuesta a estrés tanto biótico como abiótico. ZnO inhibió expresión de genes relacionados con organización celular y biogénesis. Fullerenos inhibieron genes involucrados con el transporte de electrones y con rutas energéticas. TiO ₂ afectó menos la expresión, pero todos los que se regularon están involucrados con respuesta a estrés biótico y abiótico.	Landa et al., 2013
Ag envuelta en PVP (PVP-AgNPs) 21 ± 17 nm Ag en goma arábiga (GA-AgNPs) 6. ± 1.7 nm <i>Carex lurida, C. crinita, C. scoporia, C. vulpinoidea, Scirpus cyperinus, Juncus effusus, Lolium multiflorum, Panicum virgatum, Eupatorium fistulosum, Lobelia cardinalis, Phytolacca americana</i>	PVP-AgNPs no afectó germinación; mientras que GA-AgNPs la inhibió en tres especies y la potenció en una. Con ambas se inhibió la elongación de la raíz, aunque mucho más con GA-AgNPs. PVP-AgNPs inhibió el crecimiento de una especie.	Yin et al., 2012
Ag, 18.34 nm <i>O. sativa L.</i>	Modificación de la arquitectura de las raíces secundarias. Penetración y destrucción de la pared celular. Disminución de la cantidad de azúcares, incremento de la concentración de clorofila y carotenoide.	et Mirzajan al., 2013

Ag cubierto con PVP 14 nm <i>Eruca sativa</i>	Mayor longitud de la raíz comparada con las no expuestas a los MNEs, pero similar a la desarrollada en presencia de AgNO ₃ . Efecto atribuido a iones de plata liberados.	Vannini et al., 2013
Ag, 20 nm <i>A thaliana</i>, ecotipo Columbia	Contenido de plata en las plantas mayor de MNEs que del ion Ag ⁺ . Inhibición del desarrollo de pelos radicales. Decremento en contenido de clorofila, incremento de antocianinas, incremento de peroxidación, incremento de EROs. Aumento de la expresión genética de la Sulfurilasa de ATP, de la 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa, de la sulfito reductasa, cisteína sintetasa, disminución de la glutatión sintetasa, de la glutamato ligasa, de la glutatión S-transferasa, de la glutatión reductasa, de la fitoquelatín sintetasa.	Nair & Chung 2014 a
Ag 20 nm <i>Oryza sativa</i> L.	Reducción del desarrollo y del contenido de clorofila, carotenoides y azúcar Aumento de EROs y de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo.	Nair & Chung 2014 b
CuO <50 nm <i>O. sativa</i> cv. Swarna	Inhibición de la germinación y del desarrollo de la plántula. Perooxidación de lípidos, incremento de prolina y de la actividad de enzimas antioxidantes, decremento de carotenoides,	Shaw & Hossain 2013
CuO <i>Brassica juncea</i> L.	Decremento en el desarrollo y el contenido de clorofila y carotenoides. Incremento de la lípido peroxidación. La expresión genética de superóxido dismutasa de CuZn aumento, y de catalasa y ascorbato peroxidasa decreció en raíz.	Nair & Chung 2014 c
Hierro cero Valente <i>A. thaliana</i>	No tóxicos como los iones de Fe ²⁺ , facilita elongación de raíz primaria y de hipocotilo. Promueve la producción y liberación de H ₂ O ₂ y del radical OH•, con ablandamiento de pared celular. Incremento de endocitosis.	Kim et al., 2014
Au: 24 nm <i>A. thaliana</i>	Aumentó el porcentaje de germinación, el crecimiento y el potencial antioxidante (catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa). Correlacionado con la expresión de micro RNA involucrados con germinación y desarrollo.	Kumar et al., 2013
ZnO: 44.46±4.84 nm <i>Fagopyrum esculentum</i>	Disminución de la biomasa, aumento de actividad antioxidante.	Lee et al., 2013

<p>Nanotubos de carbono 10-20 nm X1-2 μm Al₂O₃ 60 nm ZnO 20 ± 5 Al 18 nm Zn 35 nm</p> <p><i>Brassica napus, Raphanus sativus, Lolium perenne, Letuca sativa, Zea mays, Cucumis sativus</i></p>	<p>Germinación inhibida con las de Zn y ZnO en <i>Zea mays</i>.</p>	<p>Lin & Xing, 2007</p>
<p>Nanotubos de carbono (NTC) 75% con impurezas de Fe₃O₄ 12.1 ± 3.3 5.8 ± 1.9</p> <p><i>Medicago sativa, Triticum spp</i></p>	<p>No observaron daño y sí un estímulo del crecimiento. Alfalfa no ingresó por raíz, pero sí fue adsorbida, modificando el desarrollo y morfología de raíz. En trigo fueron detectados en epidermis. Presentan indicios de que se los MNEs se enlazaron con la pared celular.</p>	<p>Miralles et al., 2012 b</p>
<p>Citrato-Ag 11±0.7 nm ZnO</p> <p><i>Zea mays Brassica oleracea var. capitata L</i></p>	<p>Células de la raíz de <i>Zea mays</i> modificación estructural sin cambios en el tamaño de la raíz. No efecto en la germinación en ambas plantas. Con ZnO se produce ingreso mediante un "túnel", mientras que las de Ag no ingresan.</p>	<p>Pokherel et al., 2013</p>
<p>Nanotubos de carbono 1-2 nm X 5-30 μm</p> <p><i>Protoplastos de A. thaliana ecotipo Columbia, O. sativa subsp japonica cv. Nipponbare</i></p>	<p>Decremento de la viabilidad, sin efectos macroscópicos en la planta, mayor condensación de la cromatina, acumulación de H₂O₂, inducción de genes de respuesta a estrés oxidativo.</p>	<p>Shen et al., 2010</p>
<p>SiO₂ 12 nm</p> <p><i>Lycopersicon esculentum</i></p>	<p>Incremento en el porcentaje e índice de germinación, disminución del tiempo de germinación. Aumento de la masa seca y húmeda.</p>	<p>Siddiqui & Al-Wahibi, 2014</p>
<p>ZnO 35 ± 5 nm</p> <p><i>Schoenoplectus tabernaemontani</i></p>	<p>Inhibición del crecimiento, alta concentración de Zn en la planta, detectaron bioacumulación, aunque la mayor parte se encontró en raíz.</p>	<p>Zhang et al., 2015</p>
<p>Fullerol 1.5 ± 0.2 nm y 5 ± 0.7 nm</p> <p><i>Momordica charantia</i></p>	<p>Incremento de biomasa en un 54%, 24% más agua; 20% mayor longitud del fruto; 59% mayor número de frutos.</p>	<p>Kole et al., 2013</p>

2. JUSTIFICACIÓN

Los MNEs son partículas con dimensiones en el rango de los nanómetros y una disposición de átomos o moléculas que las hace tener propiedades fisicoquímicas únicas, diferentes a las de los mismos materiales con mayores dimensiones. Estas propiedades han sido de gran provecho de modo que los MNEs son actualmente utilizados en la elaboración de diversos productos en áreas como a) la industria farmacéutica, b) deportiva, c) cosmética, d) en la desinfección de agua y aire, entre otras. La producción de MNEs ha adquirido un gran auge, generándose MNEs de una gran cantidad de compuestos mediante técnicas de ingeniería. En la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) también se tiene el interés de producir MNEs que tengan características que superen o igualen a las que se producen en otras parte, además, por procesos poco contaminantes. Se están produciendo MNEs compuestas de TiO_2 dopadas con metales como Ag y Cu. Por su actividad antibacteriana se ha propuesto el uso de estos MNEs en la purificación de agua contaminada con microorganismos o sustancias orgánicas, con la ventaja sobre desinfectantes de uso cotidiano, de no producir compuestos potencialmente riesgosos para la salud al entrar el contacto con el agua.

Debido al bajo costo de producción, esto podría significar la posibilidad de llevar agua sin contaminantes a toda una población de una manera económica; así como una buena alternativa de tratamiento de aguas en zonas de riesgo como pueden ser los desagües hospitalarios. Sin embargo, su uso conllevaría a una liberación de estos MNEs al ambiente, una alta probabilidad de exposición de organismos y un potencial riesgo a la salud humana y del ecosistema. Por esto se hace necesario hacer una investigación de los efectos en la salud humana, así como de los efectos ambientales.

La investigación de la interacción de MNEs con plantas es de especial importancia. Las plantas están directamente expuestas al suelo, agua y aire, donde eventualmente pudieran estar dispersos MNEs liberados durante su producción, uso o eliminación. Los efectos fisiológicos en las plantas producidos por la exposición a los MNEs debe ser conocida, ya que aunque puede que no haya efectos o incluso darse efectos positivos, también pudieran ocurrir efectos adversos, que repercutirían en el proceso normal de la planta. En plantas de interés agrícola, una disminución en su desarrollo, implicaría un impacto económico y de abasto alimenticio; en otras plantas, podría tener un impacto en la prosperidad del ecosistema.

Estudiar la interacción en organismos modelo como *A. thaliana*, arrojará información sobre los posibles efectos de estos MNEs en plantas, de una manera controlada, económica y a corto plazo. Lo que servirá como referencia de los efectos que se pueden producir en otras plantas. Aunque se sabe que algunos MNEs producen efectos benéficos, como una mayor acumulación de clorofila (Li *et al.*, 2013) o un mayor porcentaje de germinación (Kole *et al.*, 2013), también se tiene conocimiento de que algunos otros afectan el desarrollo y la productividad de las plantas (Shaw & Hossain, 2013). Es necesario hacer las investigaciones para saber qué tipo de efectos producen los MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ porque incluso se piensa que pudieran tener aplicaciones en la desinfección de semillas para cultivos *In vitro*.

Además, es necesario conocer como los MNEs se fijan a las plantas, ya sea en su superficie o en su interior, ya que pudieran acumularse, teniendo una vía más de contacto de los MNEs con humanos y otros animales, lo que implicaría un impacto en la salud humana y en los ecosistemas. Investigar acerca de la distribución y acumulación de MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ en plantas ayudará a conocer los riesgos de exposición a otros organismos. Tanto una afectación en el desarrollo de las plantas, como la acumulación de estos MNEs, pueden eventualmente tener repercusiones ecológicas, de salud humana así como económicas. Por el contrario, si la exposición de MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ resulta con efectos más bien positivos que negativos, sentará las bases para el uso seguro de estos MNEs.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3. HIPÓTESIS

Se producen efectos en planta si son expuestas a los materiales nanoestructurados de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$.

Los materiales nanoestructurados de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ tienen potencial como agentes antimicrobianos y pueden ser usados para desinfección de semillas.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos producidos en plantas por la interacción con materiales nanoestructurados de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de los MNEs de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en los organismos modelo *E. coli* y *S. cerevisiae*, y en la desinfección de semillas.
2. Evaluar los efectos en *A. thaliana*, producidos por la interacción con los MNEs de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$.
3. Evaluar los efectos en cultivos de células vegetales, producidos por la interacción con los MNEs de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ en *E. coli* y *S. cerevisiae*

5.1.1 Cepas

La actividad antimicrobiana de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ fue investigada usando *E. coli* cepa C600 (F- tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ-) (Appleyard, 1954) y *S. cerevisiae* cepa W303a (MATa/MATα {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} [phi+]) (Rothstein, 1977), ambas cepas de laboratorio y organismos modelo.

5.1.2 Preparación de suspensión de microorganismos

Se sembraron los microorganismos en medio sólido y se incubaron para aislar colonias, *E. coli* en LB (Luria- Bertani) a 37 °C por 16 h y *S. cerevisiae* en PD (Papa-Dextrosa) a 28 °C por 48 h. Se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de medio líquido, se incubó a 37 °C a 150 rpm por 16 a 24 h para *E. coli*; y a 28 °C a 150 rpm por 24 h para *S. cerevisiae*. Se colocaron 1.5 ml del cultivo en un microtubo, se centrifugó a 12000 rpm por 1 min, se eliminó el sobrenadante y se disgregó la pastilla en buffer de fosfatos de potasio 0.05 M pH 7 estéril, para obtener un título de 10⁶ UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro) para *E. coli* C600 y 10⁴ UFC/ml para *S. cerevisiae* W303a.

5.1.3 Exposición de microorganismos a Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺

Se colocó 1 ml de la suspensión de microorganismos (*E. coli* o *S. cerevisiae*) en tubos de vidrio y se agregaron Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ para tener concentraciones de 0.0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml. Se incluyeron tres controles: uno con plata coloidal (0.015 mM) del desinfectante comercial BacDyn plus® (Ag⁰), otro con 1 mM CuSO₄ y el tercero sin MNEs. Se mezclaron perfectamente y se incubaron a 25 °C con agitación a 150 rpm. La inactivación de los microorganismos fue medida a diferentes intervalos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(2, 4, 6, 8 y 24 h). Para evaluar el efecto antimicrobiano del metal (Ag^0 o Cu^{2+}), algunas suspensiones fueron incubadas en la oscuridad; para demostrar el efecto fotocatalítico, otras suspensiones fueron incubadas bajo radiación (luz fluorescente 8 ft., 75 Watt). Después de la incubación, se tomó una alícuota, se sembró en medio sólido, se incubó y se contaron las colonias desarrolladas, para calcular las UFC/ml sobrevivientes. Se calculó la inactivación logarítmica como $\log_{10} (N/N_0)$, donde N_0 representa las UFC/ml iniciales y N la UFC/ml sobrevivientes al tratamiento, los resultados fueron expresados en unidades logarítmicas (U log). Se realizaron tres réplicas.

5.2 Evaluación de la actividad de los MNEs en la desinfección de semillas

Grupos de 50 semillas de *A. thaliana* Col0 fueron tratadas con 10 mg/ml de MNEs por 24 h, y el tratamiento previo con etanol al 70% y Tween 20 al 0.15% fue evaluado también. Se incluyó un grupo control positivo tratado con hipoclorito de sodio y tween 20, desinfectantes tradicionales; y otro grupo control negativo tratado con H_2O destilada estéril. Posterior al tratamiento, las semillas se enjuagaron 5 veces con H_2O destilada estéril, se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido, se incubaron a 25°C y se observaron para detectar desarrollo de contaminantes. El experimento fue llevado a cabo por triplicado.

5.3 Evaluación de la actividad de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ contra hongos contaminantes de semillas

Se aislaron hongos contaminantes de semillas de *A. thaliana* (*Aspergillus* spp y *Fusarium* spp) se incubó bajo luz visible con 10 mg/ml de MNE durante 24 h, posteriormente una alícuota de 10 μl se inoculó en medio PD sólido y se incubó a 25°C durante 3 días. Se realizaron tres réplicas. Los diámetros de las colonias fueron medidos y se calculó el porcentaje de inhibición radial (% IR), que considera el diámetro del hongo sin MNEs (D), y el diámetro del hongo tratado con MNEs (d), en la siguiente fórmula (Kim *et al.*, 2012):

$$\% \text{ IR} = (D-d) 100/D$$

5.4 Evaluación de los efectos de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ en *A. thaliana*

5.4.1 Material biológico

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia Col-0 de plantas silvestres y de las mutantes insensibles a etileno *etr1-1* (Bleeker et al., 1988), *ein2-1* (Guzmán & Ecker 1990) y *ein3-1* (Kieber et al., 1993).

También se utilizaron células en suspensión de *A. thaliana* cultivadas en MS suplementado con 0.065 μ M de cinetina y 1.086 μ M de 2,4-D, 15 ml de precultivo en 40 ml de medio, con agitación 110 a 150 rpm, a temperatura de 23 a 25 °C, con fotoperiodos de 16 h luz 8 h oscuridad, durante una semana.

5.4.2 Evaluación del crecimiento

Semillas de *A. thaliana* se desinfectaron por técnica tradicional (con hipoclorito de sodio al 5% y Tween 20 al 0.15% durante 8 minutos), se incubaron en H₂O destilada estéril a 4°C durante 3 días, y se expusieron a los MNEs en tres condiciones: a) semillas expuestas a los MNEs durante 24 h, para observar su germinación en papel filtro y/o desarrollo en medio MS sólido; b) plántulas expuestas a los MNEs en H₂O destilada o MS líquido durante una semana para observar su elongación; y c) plántulas de dos días de germinadas expuestas a los MNEs durante 1 día en H₂O destilada estéril, lavadas e incubadas en MS durante 4 días más para observar su elongación. Los medios se complementaron con 0.0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml de Ag@TiO₂ o TiO₂-Cu²⁺, con 0.015 mM de Ag⁰ o 1 mM CuSO₄, o con 1 mg/ml de Ag@TiO₂ y 10 y 50 μ M de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. La longitud de las plántulas fue medida con el programa Motic Images Plus 2.0, desde el comienzo del tallo hasta la punta de la raíz.

5.4.3 Evaluación del contenido de clorofila

Plántulas expuestas a los MNEs durante un día o una semana se incubaron en etanol al 96% (v/v) (50 mg de plántulas por 10 ml de etanol) en la oscuridad, a 4°C por 3 días. Se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 665 y 649 nm (A_{665} y A_{649}), con el espectrofotómetro (Thermo scientific Genesys 10S UV-Vis). El contenido total de clorofila se calculó con las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a (Cla)} = (13.95) (A_{665}) - (6.88) (A_{649}),$$

$$\text{Clorofila b (Clb)} = (24.96) (A_{649}) - (7.32) (A_{665}),$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Cla} + \text{Clb}$$

5.4.4 Evaluación del contenido de antocianinas

Plántulas expuestas a los MNEs durante un día o una semana se incubaron en metanol/HCl (99:1) a 4°C durante toda la noche. Se midió la absorbancia de los extractos a 530 y 657 nm (A_{530} y A_{657}) con el espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis) y se calcularon las unidades relativas de antocianina (URA) con la siguiente ecuación:

$$\text{URA/g} = [A_{530} - (0.25 \times A_{657})]$$

5.4.5 Evaluación de la actividad de catalasa

La actividad de catalasa se analizó tanto en plántulas como en cultivos celulares de *A. thaliana*. Las plántulas se expusieron a los MNEs durante un día a los dos días de germinadas y se dejaron desarrollar una semana. Los cultivos celulares se incubaron durante una semana y se expusieron a los MNEs durante un día. El tejido vegetal se enjuagó con H₂O destilada para eliminar los MNEs, se maceró con mortero en buffer de extracción (ver Apéndice), y se recuperó el extracto acuoso (proteico). Se determinó la concentración de proteínas en cada extracto mediante Bradford (1976), usando albúmina sérica de bovino como estándar y midiendo la absorbancia a 595 nm. La actividad de catalasa se midió mediante la técnica de Aebi *et al.*, (1982), con ligeras adecuaciones: a 400 µl de buffer de reacción (ver Apéndice) se añadieron 100 µl del extracto proteico, se midió la absorbancia a 240 nm a los 10, 40 y 70 s después

de hacer la mezcla, con el espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis) usando como blanco aire. Los resultados se reportaron como Unidades de catalasa, que representan la degradación del H₂O₂ en mM por minuto por mg de proteína.

5.4.6 Evaluación de la expresión genética

5.4.6.1 Extracción de RNA

Se realizó una extracción de RNA a plántulas expuestas mediante la técnica de López-Gómez & Gómez-Lim (1992) con ligeras adecuaciones: se homogeneizó el tejido vegetal en mortero con nitrógeno líquido, se colocó el tejido en microtubos y se adicionó buffer de lisis (ver Apéndice) en una proporción de 1:5 (V/V). Se añadió ¼ de volumen de etanol absoluto y 1/9 de 5 M acetato de potasio y se mezcló vigorosamente. Se hizo una extracción con fenol-cloroformo (1:1) y otra con cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). La fase acuosa se mezcló con 1 volumen de 6 M cloruro de litio para llevar a una concentración final de 3 M, se incubó a -20 °C durante toda la noche. El RNA se recuperó por centrifugación (12000 rpm durante 20 min), se lavó con 70% etanol, se disolvió en H₂O destilada estéril, se analizó mediante electroforesis y se cuantificó espectrofotométricamente (Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis).

5.4.6.2 Análisis por RT-PCR

Las muestras de RNA se trataron con DNasa con el kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega # M6101): se preparó una mezcla con 1 µg de RNA, 1 µl de buffer de reacción 10X, 1µl (1 U) de la enzima *RQ1 RNase-Free DNase*, y H₂O libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 10 µl. Se incubó a 37°C durante 30 min. Se añadió 1 µl de solución de paro *RQ1*, se incubó a 65°C por 10 min. Se cuantificó mediante espectrofotometría. Las muestras de RNA libre de DNA se utilizaron para llevar a cabo el RT-PCR con el kit *AccessQuick RT-PCR System* (Promega # Size 100 reactions): se preparó una mezcla de reacción con 500 ng de RNA, 5 µl de AccessQuick Master Mix 2X, 1 µM de cada oligonucleótido F y R (Tabla 4), H₂O libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 10 µl y 1 U de la enzima *AMV Reverse Transcriptase*. Se incubó a 45°C por 45 minutos y después a los ciclos del PCR (95 °C/ 5 min; 30 repeticiones 95 °C/ 1 min, 50 °C/ 1 min, 72 °C/ 1 min; 72 °C/ 7 min). El

RNA y los productos del RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para el análisis de RT-PCR.

Gen	F	R
Ascorbato peroxidasa (APX)	5'-CCAACCGTGAGCGAAGATTACAAG-3'	5'-TCTCGACCAAAGGACGGAAAACA-3'
Superóxido dismutasa (SOD)	5'-CAGCTTTTGGACCTCGTG-3'	5'-TGCATGGACAACAACAGC-3'
Expansina (EXP)	5'-GSNCAYGCNACNTTYTAYGGNG-3'	5'-YTGCCARTTYTGNCCCCARTT-3'
Late Embryogenesis Abundant (LEA)	5'-CAAAAATGAGTGAACAAG-3'	5'-CATAATCTTGCGGTGAC-3'
Actina (ACT)	5'-AACTGGGATGACATGGAGAA-3'	5'-ATCACACTTCATGATGGAGTTG-3'

5.5 Cuantificación de plata y cobre mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica

Plántulas expuestas a los MNEs durante un día o una semana, se lavaron con H₂O destilada estéril y con 10 mM EDTA pH 8, para remover metal adherido a la superficie, se secaron a 75 °C durante 48 h, se añadió HNO₃ concentrado y se incubaron a 115 °C por 1 h, se ajustó el volumen con H₂O desionizada para tener 1 mg de tejido vegetal/ml. Las plántulas procesadas y los medios en que se desarrollaron se filtraron y acidificaron con HNO₃ para su análisis mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica (Analyst AS-90Plus).

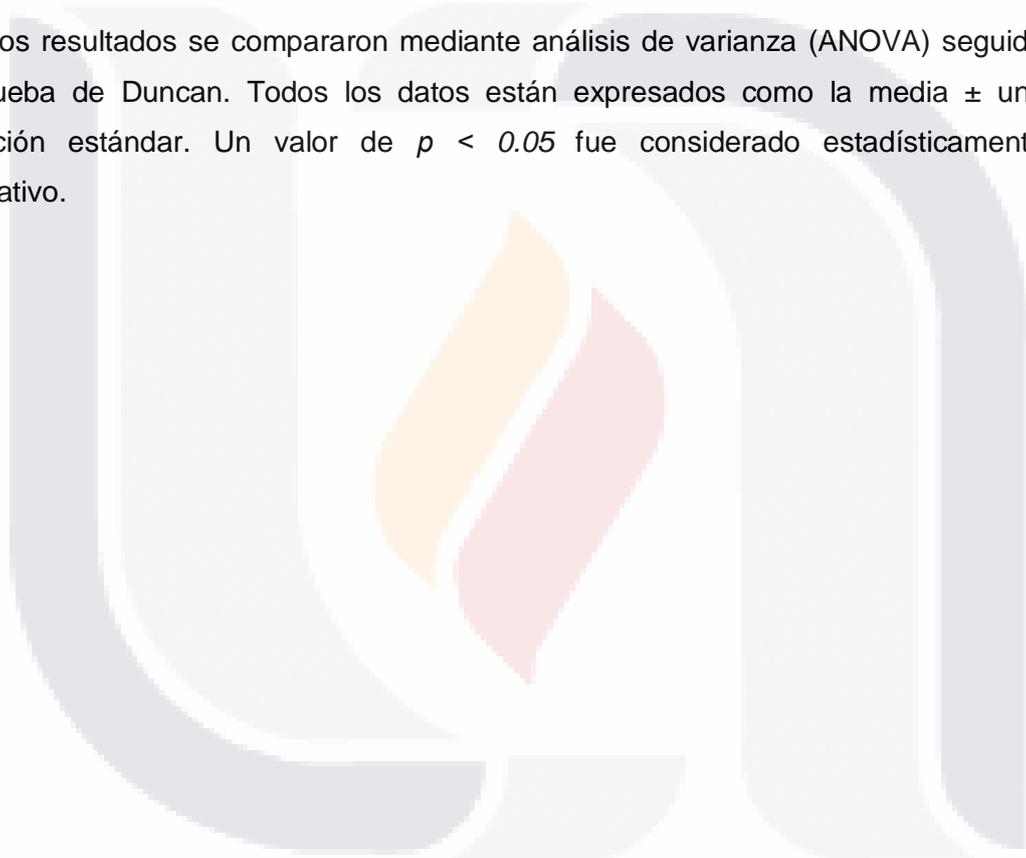
5.6 Observación al Microscopio Electrónica de Barrido

Plántulas a analizar se colocaron en un microtubo con glutaraldehído al 1.5%, se incubaron a 4 °C durante un día y se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos 50 mM

pH 7. Se hicieron incubaciones sucesivas en etanol al 70, 80, 90 y 96% durante 15 min en cada uno, y etanol al 100% durante media hora dos veces. Se secaron en el aparato de punto crítico (Smadri Touimis) a una presión de 1072 psi y 31 °C durante 4 min. Se colocaron en una cinta de grafito para recubrir con oro. Las muestras se analizaron con el Microscopio Electrónico de Barrido (Joel JSM-5900LV) y se capturaron imágenes de diferente magnificación.

5.7 Análisis estadístico

Los resultados se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido por prueba de Duncan. Todos los datos están expresados como la media \pm una desviación estándar. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.



6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana los MNEs de Ag@TiO₂ y de TiO₂-Cu²⁺ en los organismos modelo *E. coli* y *S. cerevisiae*, y en la desinfección de semillas.

6.1.1 Evaluación de la actividad de los MNEs contra *E. coli* y *S. cerevisiae*

La actividad antimicrobiana se evaluó exponiendo cultivos en suspensión de *E. coli* (10⁶ UFC/ml) y *S. cerevisiae* (10⁴ UFC/ml) a diferentes concentraciones de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ durante diferente tiempos, tanto bajo irradiación de luz visible y/o en la oscuridad. Posterior a la exposición se inocularon en medio sólido e incubaron para cuantificar las UFC/ml y calcular la inactivación en unidades logarítmicas (U log). Los resultados indican que Ag@TiO₂ presenta una fuerte inactivación bacteriana (3 U log) en un corto periodo de tiempo (2 h con 10 mg/ml de MNEs), y que a tiempos prolongados se logra una inactivación con cantidades menores: 2.2 U log con 0.5 mg/ml y 2.9 U log con 1 mg/ml a las 4 h de exposición (Fig. 13a). No se encontraron diferencias significativas entre la inactivación llevada a cabo bajo radiación y en la oscuridad (Fig. 13a y 13b) La plata coloidal provoca una inactivación bacteriana de 6 U log en 2 h (Fig. 13a y 13b). Por su parte, *S. cerevisiae* fue más resistente que *E. coli* a la plata coloidal y al Ag@TiO₂ (Fig. 13c y 13d). Se requirió un mayor tiempo de exposición a los MNEs, para lograr una adecuada inactivación de *S. cerevisiae*: 2.6 U log con 10 mg/ml bajo radiación después de 24 h (Fig. 13c) y 1.9 U log con 10 mg/ml en la oscuridad después de 24 h (Fig. 13d). En *E. coli* expuesto a TiO₂-Cu²⁺ no se observó inactivación en ninguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 13e), mientras que en *S. cerevisiae* sí se presentó inactivación con 1.9 U log con 10 mg/ml después de 24 h (Fig. 13f).

6.1.2 Evaluación de la actividad de los MNEs en la desinfección de semillas

Se evaluó la posibilidad de utilizar los MNEs de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en la desinfección de semillas para su cultivo *in vitro* en condiciones axénicas. Para esto, semillas de *A. thaliana* se trataron con 10 mg/ml de estos MNEs durante 24 h, y entonces se sembraron en medio MS sólido. Los resultados indican que el tratamiento de semillas de *A. thaliana* con estos MNEs es insuficiente para su cultivo *in vitro*, ya que no se consiguió una inhibición total del crecimiento de contaminantes: con Ag@TiO_2 72%; con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$: 36%; y sin MNEs 41% de inhibición (Fig. 14a).

Para investigar la actividad de los MNEs sobre contaminantes de semillas, se aislaron dos hongos desarrollados en semillas de *A. thaliana* sin desinfectar, cultivadas en medio MS. Los hongos identificados como *Aspergillus* spp y *Fusarium* spp, se expusieron a los MNEs bajo irradiación durante 24 h, se sembró una alícuota en medio sólido y se dejó desarrollar, para medir el diámetro de la colonia. Los resultados muestran una ligera inhibición en el crecimiento de los hongos expuestos a los MNEs, con un porcentaje de inhibición radial: para *Aspergillus* spp, de 35% con Ag@TiO_2 y 45% con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$; y para *Fusarium* spp de 17% con Ag@TiO_2 y 34 % con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ (Fig. 14b).

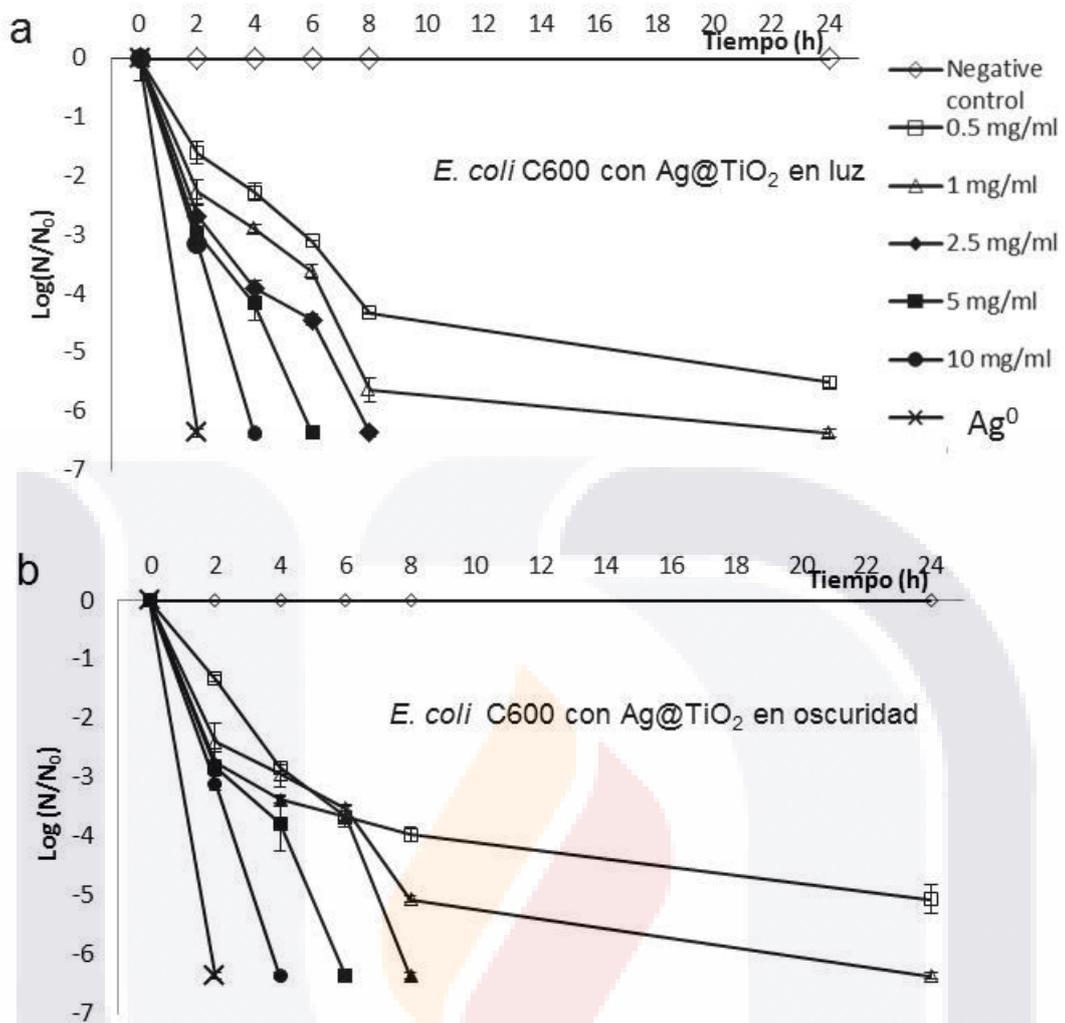


Figura 13. Inactivación logarítmica de microorganismos. Actividad de Ag@TiO₂ contra *E. coli* bajo irradiación (a) y en la oscuridad (b).

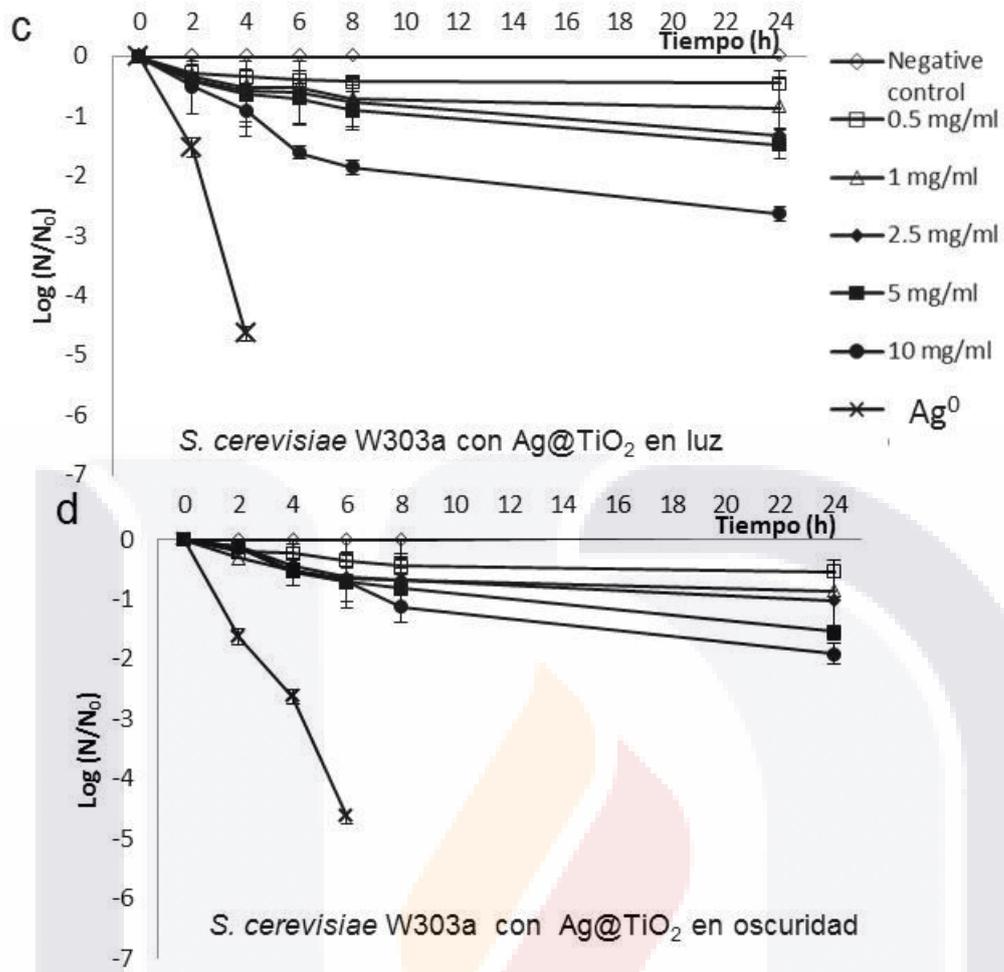


Figura 13. Actividad de Ag@TiO₂ contra *S. cerevisiae* bajo irradiación (c) y en la oscuridad (d).

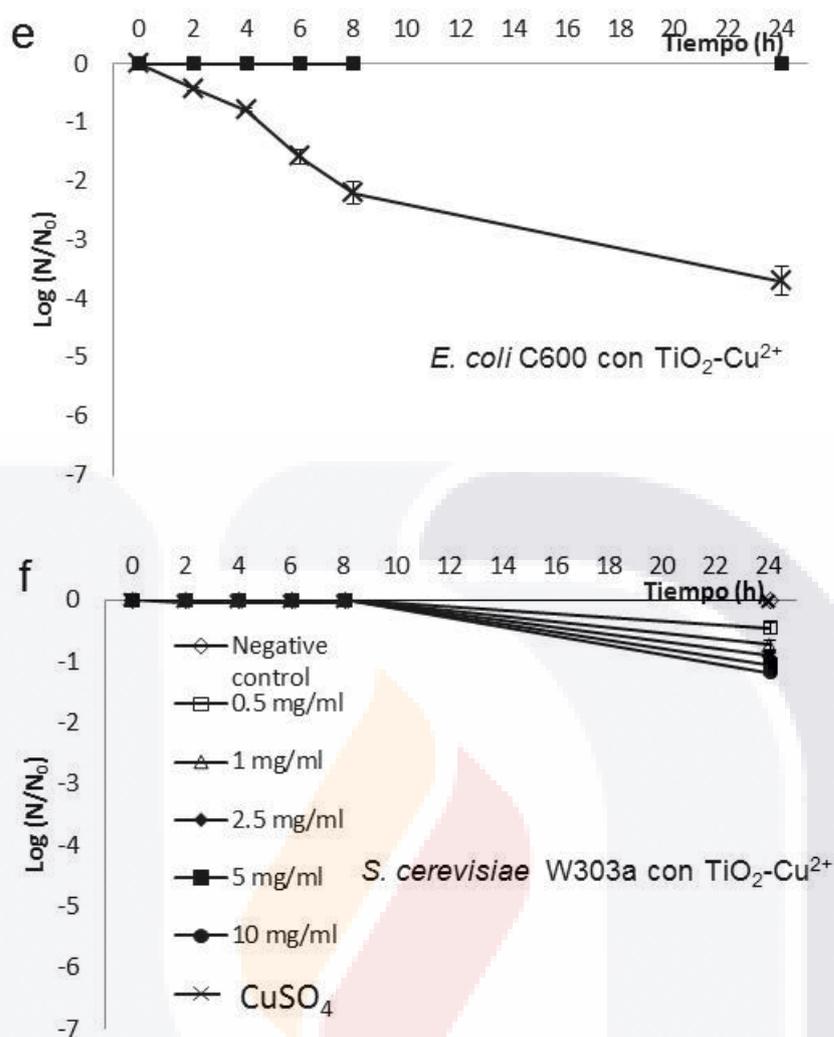
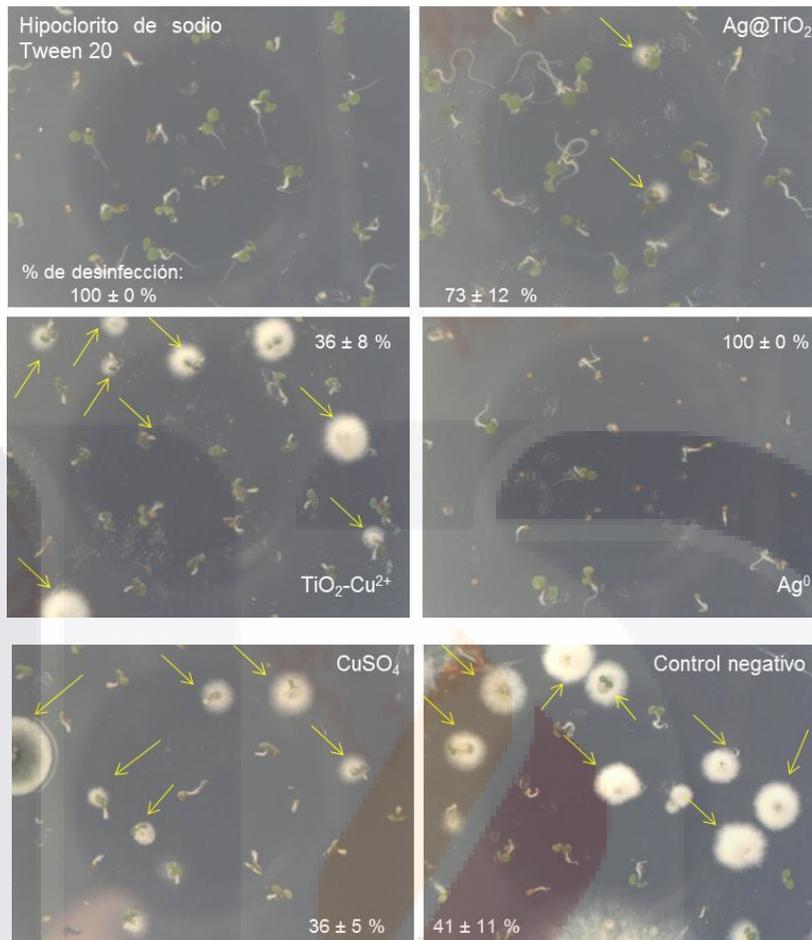


Figura 13. Actividad de TiO₂-Cu²⁺ contra *E. coli* (e) y *S. cerevisiae* (f).

a) Tratamiento de semillas para su cultivo *in vitro*



b) Tratamiento de hongos con 10 mg/ml de MNEs

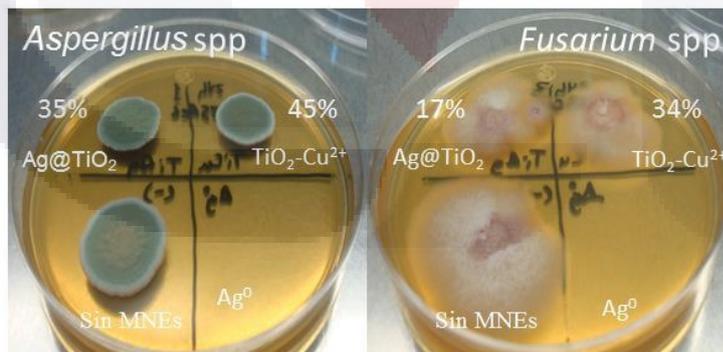
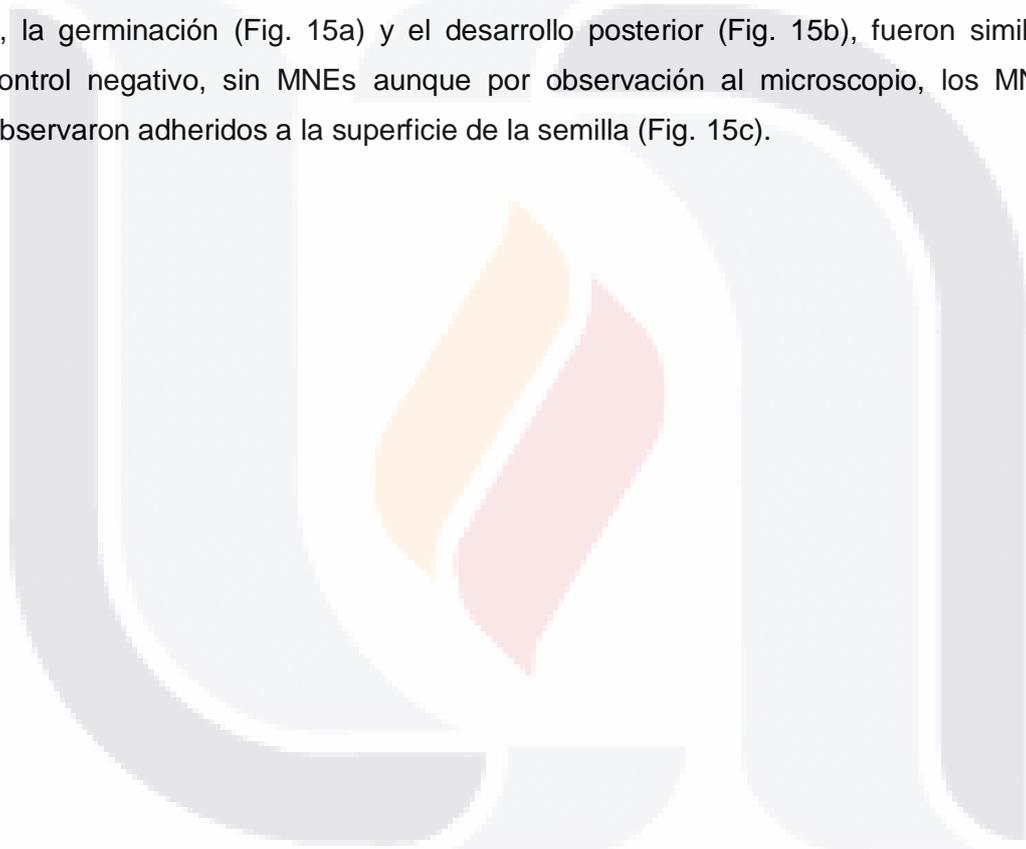


Figura 14. Semillas y sus contaminantes tratados con Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺. (a) Semillas de *A. thaliana* incubadas durante una semana, después de ser tratadas para su desinfección con hipoclorito de sodio y Tween 20 por 8 min; Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺, por 24 h; Ag⁰ por 10 min, CuSO₄ por 24 h; y el control negativo en agua destilada estéril por 24 h. Las flechas indican el crecimiento de contaminantes; lo números muestran el porcentaje de desinfección ± una desviación estándar (N = 3). (b) Los hongos aislados de semillas cultivadas sin desinfectar, fueron tratados con Ag⁰, Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ durante 24 h, inoculados en medio sólido e incubados durante 3 días. Los números indican el porcentaje de inhibición radial. (N = 3).

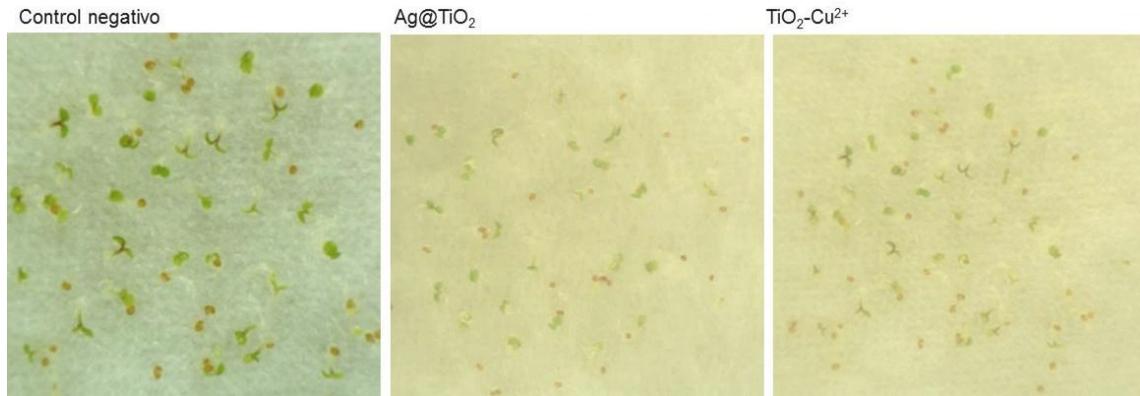
6.2 Evaluación de los efectos en *A. thaliana*, producidos por la interacción con los MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺

6.2.1. Evaluación de la germinación y desarrollo de semillas expuestas a los MNEs

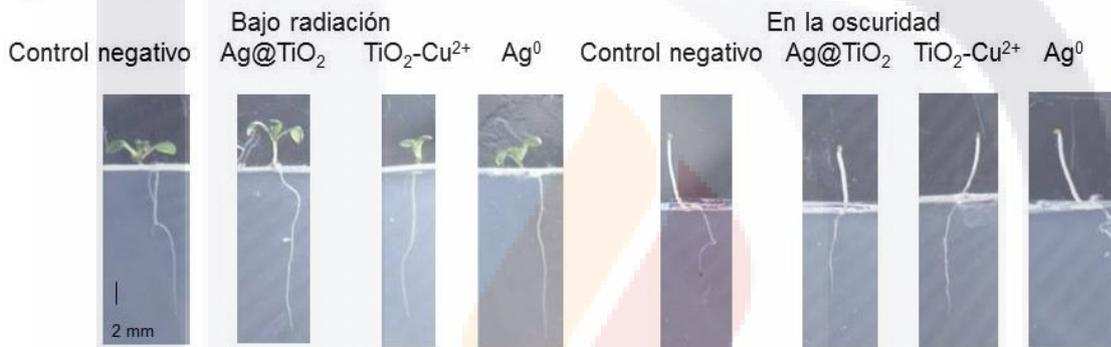
Se expusieron semillas de *A. thaliana* a diferentes concentraciones de los MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺, durante 24 h, y se analizó el porcentaje de germinación y el desarrollo posterior. Los resultados muestran que en las expuestas a los MNEs por 24 h, la germinación (Fig. 15a) y el desarrollo posterior (Fig. 15b), fueron similares al control negativo, sin MNEs aunque por observación al microscopio, los MNEs se observaron adheridos a la superficie de la semilla (Fig. 15c).



a) Germinación



b) Desarrollo en MS sólido



c) Semillas

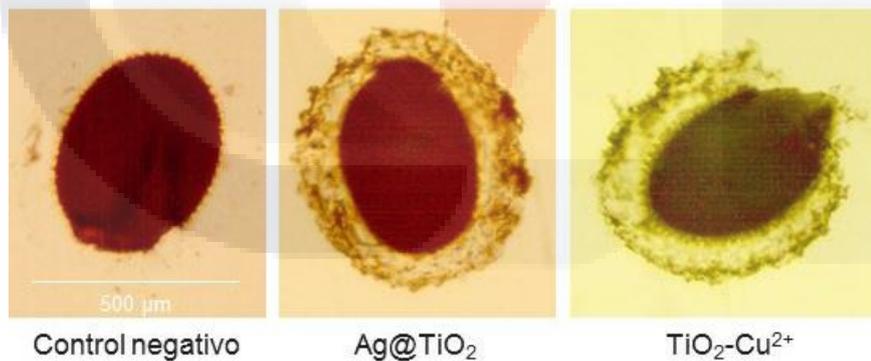


Figura 15. Germinación y desarrollo de semillas. Semillas de *A. thaliana* expuestas por un día a Ag@TiO_2 y de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ mostraron (a) una germinación similar al grupo control sin MNEs y (b) un desarrollo normal en medio sólido, aunque (c) los MNEs se observaron adheridos a la superficie de la semilla mediante microscopía óptica.

6.2.2 Evaluación del crecimiento de plántulas silvestres de *A. thaliana* expuestas a los MNEs

Se evaluó el efecto de los MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ en plántulas de *A. thaliana* expuestas en diferentes condiciones. Se midieron las plántulas desde el inicio del tallo hasta la raíz y se compararon con su respectivo control negativo. Algunos grupos de plántulas presentaron un crecimiento diferente que las del grupo control, en ese caso se calculó el porcentaje en que la elongación fuera mayor o menor, multiplicando por 100 la diferencia de crecimiento entre el grupo tratado y el control, y dividiendo entre el crecimiento del grupo control. En un primer experimento, se colocaron semillas de *A. thaliana* en MS o agua destilada estéril con diferentes concentraciones de los MNEs y se incubaron bajo irradiación de luz visible durante una semana. Los resultados se muestran en las Figuras 16a, 16b, 16c, 16d, 17a y 17b. Las plántulas expuestas en MS a 0.5 y 1 mg/ml de Ag@TiO₂ no presentaron diferencias significativas con respecto al control; sin embargo, las expuestas a 2.5, 5 y 10 mg/ml de ese MNEs, tuvieron un menor crecimiento: las expuestas a 2.5 mg/ml crecieron un 45% (0.48 ± 0.14 cm) menos que las del control negativo (0.87 ± 0.26 cm), mientras que las expuestas a 10 mg/ml crecieron un 56% menor (0.38 ± 0.76 cm) (Fig. 16a y 17a). Por otra parte, las plántulas expuestas en H₂O a 0.5 y 1 mg/ml Ag@TiO₂ no mostraron diferencias significativas con respecto del control negativo; en tanto que la expuestas a 2.5, 5 y 10 mg/ml, presentaron una menor elongación: las expuestas a 2.5 mg/ml mostraron una elongación 59% menor (0.4 ± 0.1 cm) que las del control negativo (1 ± 0.1 cm), (Fig. 16c y 17a); mientras que con 10 mg/ml las semillas no germinaron. Por su parte, otro grupo de semillas expuestas y desarrolladas bajo irradiación continua en presencia de 0.015 mM de plata coloidal durante una semana, tuvieron una elongación similar a las plántulas del control negativo cuando la exposición fue realizada en MS (Fig. 16a y 17a), mientras que las plántulas expuestas en agua mostraron una elongación 86% menor (0.13 ± 0.03 cm) (Fig. 16c y 17a). En el experimento realizado con TiO₂-Cu²⁺, las plántula expuestas en MS (Fig. 16d y 17b) a 0.5 y 1 mg/ml no mostraron diferencias significativas con respecto del control negativo, mientras que las expuestas a 2.5, 5 y 10 mg/ml presentaron una elongación menor: las expuestas a 2.5 mg/ml un 30% (0.6 ± 0.17 cm) menor, y las expuestas a 10 mg/ml un 62.4% (0.33 ± 0.09 cm) menor que las del control negativo. Por su parte, las plántulas expuestas en agua a TiO₂-Cu²⁺ presentaron de un menor elongación con todas las concentraciones evaluadas: con 0.5 mg/ml 89% menor (0.11 ± 0.1 cm) que el control negativo; con 10 mg/ml la inhibición fue total (Fig. 16b, 16d y 17b). En el grupo de

plántulas expuestas a 1 mM CuSO₄ durante una semana limitó la germinación de las semillas (Fig. 16b, 16d y 17b).

En otro experimento, las semillas de *A. thaliana* se incubaron para obtener plántulas de dos días de germinadas, entonces se expusieron a los MNEs bajo irradiación o en la oscuridad durante un día. Los resultados se muestran en la Figura 16e, 16f, 16g, 16h, 17a y 17b. Algunos grupos de plántulas expuestas a Ag@TiO₂ bajo irradiación, mostraron una mayor elongación que su control negativo: las expuestas a 0.5 mg/ml un 65% (2.2 ± 0.5 cm), a 1 mg/ml un 59% (2.1 ± 0.5 cm) y a 2.5 mg/ml un 57% (2 ± 0.6 cm) mayor con respecto al control negativo (1.3 ± 0.3 cm). Las plántulas expuestas a 5 mg/ml no mostraron diferencias significativas con respecto al control; mientras que las expuestas a 10 mg/ml de Ag@TiO₂ presentaron un crecimiento 81% (0.24 ± 0.1 cm) menor que el control negativo (Fig. 16e y 17a). Cuando la exposición fue realizada en la oscuridad, las plántulas no mostraron efecto diferencias significativas en ningunas de las condiciones evaluadas (Fig. 16g y 17a). Por su parte, las plántulas de dos días de germinadas expuestas a plata coloidal por un día, mostraron un crecimiento similar a las del control negativo, tanto cuando el tratamiento fue bajo irradiación continua como en la oscuridad (Fig. 16e, 16g y 17a). En el experimento realizado en plántulas de dos días de germinadas expuestas con TiO₂-Cu²⁺ por un días, se observó que las expuestas a 0.5 mg/ml no mostraron diferencias significativas en elongación con respecto al control negativo; sin embargo, en las expuestas a 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺, presentaron una elongación de 59% a 70% menor que las plántulas del control negativo (Fig. 16f y 17b). Por su parte, cuando el experimento se llevó a cabo en la oscuridad, y las plántulas se expusieron a concentraciones de 0.5, 1 y 2.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ por un día, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento con respecto a su control negativo; mientras que a concentraciones de 5 y 10 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ se observó una elongación de 65.3 % (0.46 ± 0.16 cm) a 82.6 % (0.25 ± 0.13 cm) menor que el control negativo (Fig. 16h y 17b). Las plántulas expuestas a 1 mM CuSO₄ por un día, mostraron una menor elongación 57.5 % bajo irradiación (0.5 ± 0.1 cm) y 79.6% en la oscuridad (0.3 ± 0.1 cm) que el control negativo (Fig. 16f, 16h y 17b).

En otro experimento, las semillas se incubaron en el medio MS para obtener plántulas, entonces se expusieron a diferentes concentraciones de los MNEs en fotoperiodos (16 luz/ 8 oscuridad) durante diferentes tiempos, al cabo de una semana se midieron las plántulas desde el comienzo del tallo hasta la punta de la raíz. Los resultados se muestran en las Figuras 18a, 19a, 20a y 21a. Algunos grupos de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

plántulas presentaron una elongación diferente a las del control negativo, en esos casos se calculó el porcentaje de elongación mayor o menor, multiplicando por 100 la diferencia entre la media del grupo tratado y el control, y dividido entre la media del control. Las diferencias porcentuales se presentan en la Tabla 5. Las plántulas expuestas a 0.5 y 1 mg/ml de Ag@TiO₂ en fotoperiodos por un día, crecieron más que las del grupo control, presentaron una elongación 35% (1.7 ± 0.07 cm) y 45% (1.8 ± 0.3) mayor que las del control negativo (1.3 ± 0.12 cm), respectivamente; mientras que en las que se expusieron a las mismas concentraciones por 3, 5 y 7 días, no se observaron diferencias significativas (Fig. 18a y 19a). Por su parte, algunos grupos de plántulas al ser expuestas a Ag@TiO₂ en fotoperiodos, presentaron una elongación menor que el control negativo. Por ejemplo, las plántulas mostraron un 85% (0.2 ± 0.07 cm), 88% (0.15 ± 0.07 cm), 91% (0.12 ± 0.06 cm) y 92% (0.1 ± 0.05 cm) de reducción en el crecimiento, por exposición a 10 mg/ml de Ag@TiO₂ durante 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente (Fig. 18a y 19a, Tabla 5). Las plántulas expuestas a plata coloidal en fotoperiodos por un día, presentaron un crecimiento similar a las del control negativo; sin embargo, el crecimiento fue 62%, 87% y 90% menor que el control negativo, después de 3 días (0.5 ± 0.15 cm), de 5 días (0.17 ± 0.05 cm), de 7 días (0.12 ± 0.05 cm), respectivamente (Fig. 18a y 19a). Por su parte, las plántulas expuestas a TiO₂-Cu²⁺ en fotoperiodos, presentaron un menor porcentaje de crecimiento que el control negativo (1.3 ± 0.1 cm): de 54% (0.6 ± 0.18 cm), 62% (0.5 ± 0.07 cm), 65% (0.45 ± 0.1 cm) y 69% (0.4 ± 0.05 cm) menor que el control negativo con 10 mg/ml en exposición por 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente (Fig. 20a y 21a y Tabla 5). En las plántulas expuestas a 1 mM CuSO₄ en fotoperiodos se observó un crecimiento 76.9%, 80.8%, 84.6% y 92.3% menor después de 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente (Fig. 20a y 21a y Tabla 5).

Se realizó una variante del experimento del párrafo anterior, donde las plántulas se incubaron en la oscuridad durante una semana y se expusieron a los MNEs por tiempos de 1, 3, 5 y 7 días. Las plántulas de dos días de germinadas, desarrolladas y expuestas a Ag@TiO₂ en la oscuridad (Fig. 18b y 19b), presentaron una elongación significativamente mayor a la del control negativo (1.3 ± 0.13 cm): 38.5 % mayor con 0.5 (1.8 ± 0.07 cm) y 76.9 % mayor con 1 mg/ml (2.3 ± 0.27 cm) después de un día de exposición (Tabla 5). Mientras que las plántulas expuestas a concentraciones de 10 mg/ml de Ag@TiO₂ en la oscuridad, mostraron un crecimiento 38%, 46%, 54% y 62% menor que el control, después de 1 día (1 ± 0.14 cm), 3 días (0.9 ± 0.14 cm), 5 días (0.8 ± 0.05 cm) y 7 días de exposición (1.1 ± 0.13 cm), respectivamente (Fig. 18b y

19b y Tabla 5). Plántulas desarrolladas y expuestas en la oscuridad a plata coloidal también mostraron un menor crecimiento que el control negativo, 62%, y 91% menor que el control negativo, cuando el tratamiento fue por 5 días (0.5 ± 0.05 cm), y por 7 días (0.12 ± 0.05 cm), respectivamente (Fig. 18b y 19b y Tabla 5). Por su parte, las plántulas desarrolladas y expuestas en la oscuridad a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, no mostraron diferencias significativas a concentraciones bajas y tiempos menores, con respecto del control; mientras que a concentraciones mayores, presentaron un menor porcentaje de crecimiento que el control negativo (1.3 ± 0.12 cm): de 38% (0.8 ± 0.1 cm); 62% (0.5 ± 0.12 cm), 69% (0.4 ± 0.1 cm) y 77% (0.3 ± 0.05 cm) con 10 mg/ml después de 1, 3, 5 y 7 días de exposición (Fig. 20b y 21b y Tabla 5). Las plántulas expuestas a 1 mM de CuSO_4 en la oscuridad, mostraron un menor porcentaje de crecimiento que el control negativo: de 38.8%, 53.8% y 61.5% menor después de 3 días (0.12 ± 0.04 cm), 5 días (0.11 ± 0.05 cm) y 7 días (0.1 ± 0.04 cm), respectivamente (Fig. 20a, 20b, 21a y 21b y Tabla 5).



Figura 16. Plántulas de *A. thaliana* incubadas en diferentes condiciones. Semillas incubadas (a y b) en MS (c y d) y en agua, durante una semana; y plántulas de dos días de germinadas expuestas (e y f) bajo irradiación de bajo luz visible y (g y h) en la oscuridad, durante un día.

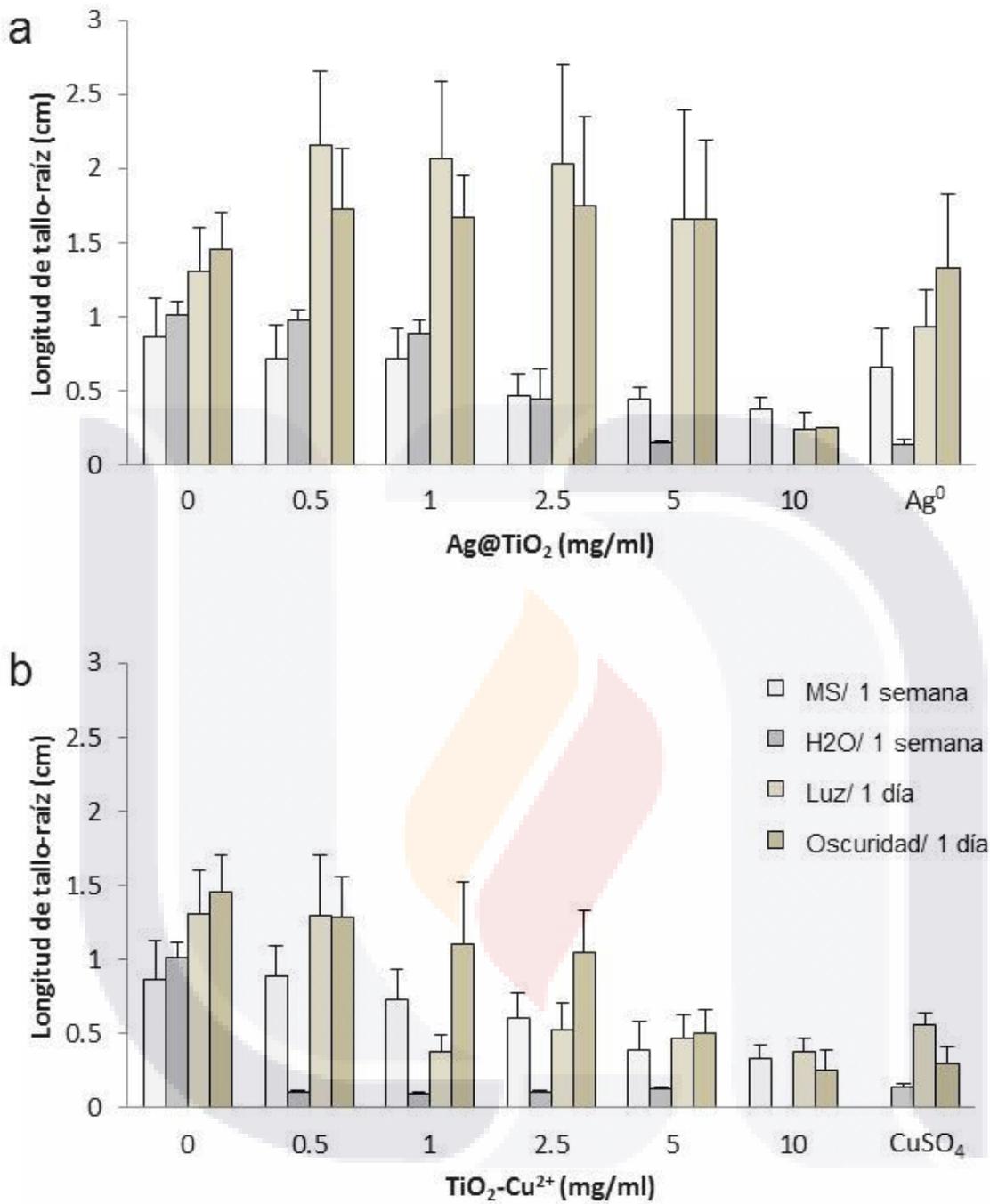


Figura 17. Gráficas de elongación de *A. thaliana* incubadas en diferentes condiciones. Las plántulas fueron incubadas en medio MS o H₂O donde germinaron y desarrollaron en presencia de los MNEs durante una semana; o fueron germinadas y después de dos días expuestas a los MNEs bajo irradiación o en la oscuridad durante un día. Las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 10.

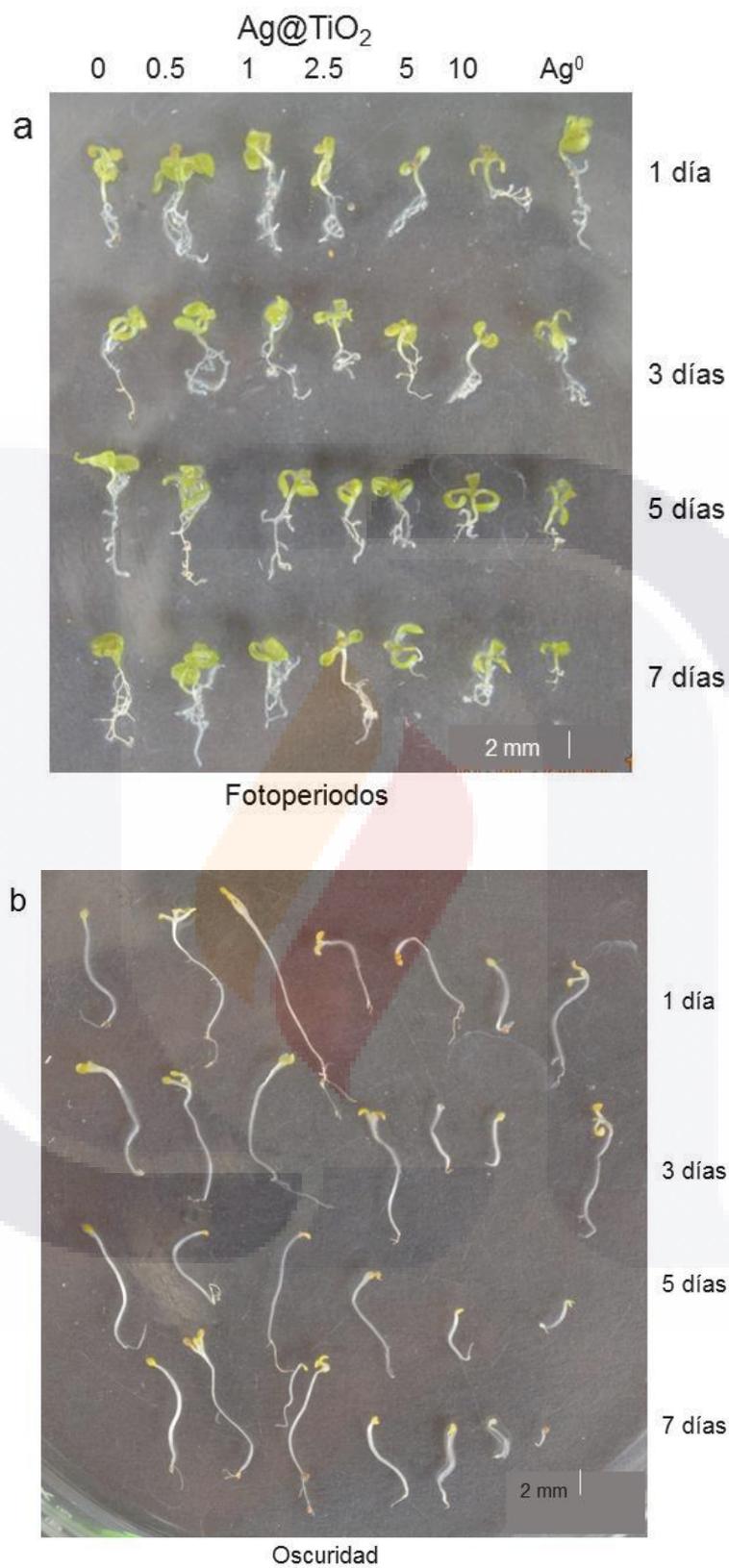


Figura 18. Plántulas de *A. thaliana* expuestas a Ag@TiO_2 durante distintos tiempos. Plántulas representativas después de su exposición a concentraciones de 0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml de Ag@TiO_2 y a plata coloidal (Ag^0), durante 1, 3, 5 y 7 (a) en fotoperiodos y (b) en la oscuridad.

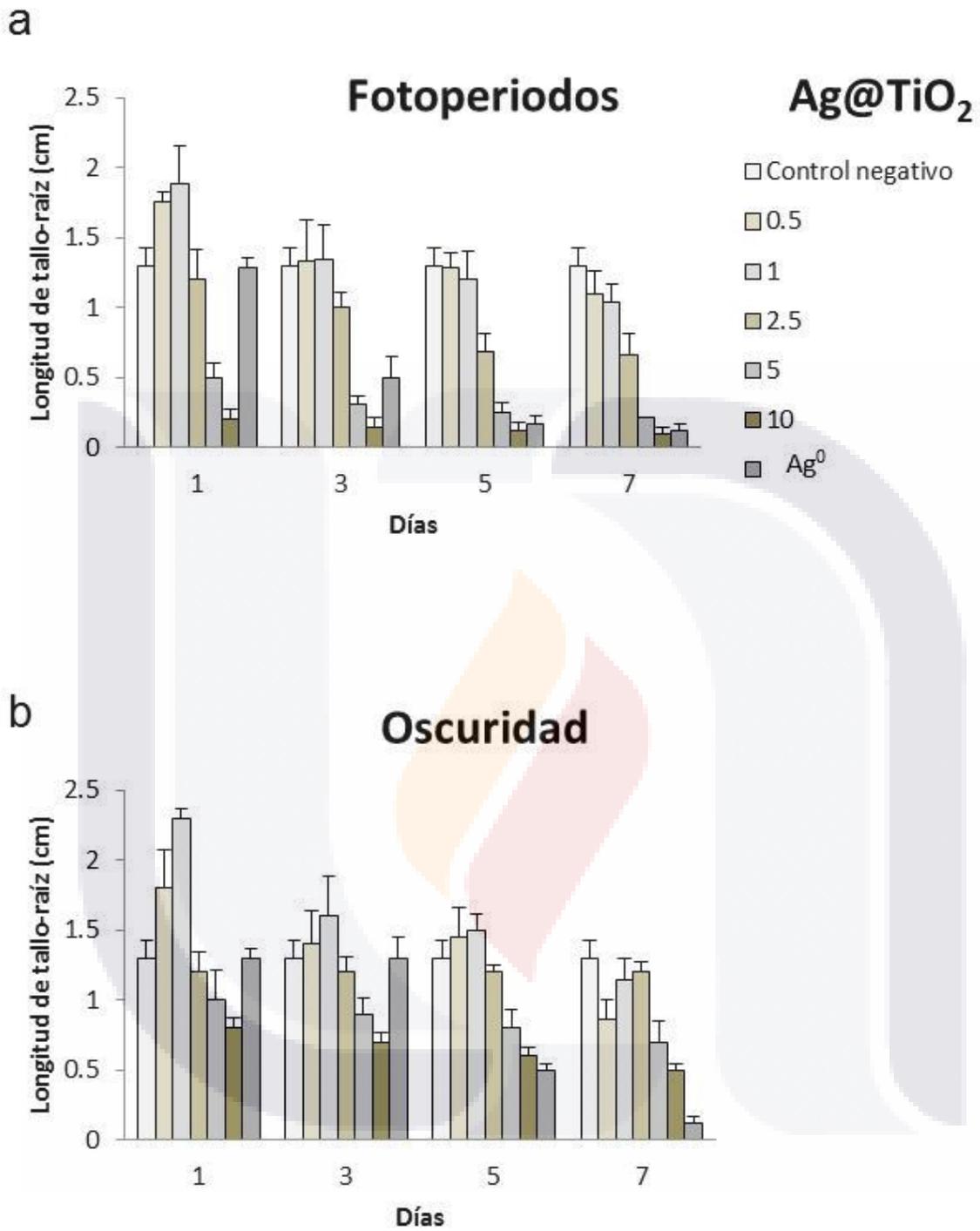


Figura 19. Gráficas de elongación de plántulas de *A. thaliana* expuestas a Ag@TiO₂ durante distintos tiempos. Medida de plántulas expuestas a diferentes concentraciones de Ag@TiO₂ (a) en fotoperiodos y (b) en la oscuridad, durante distintos tiempos. Las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 10.

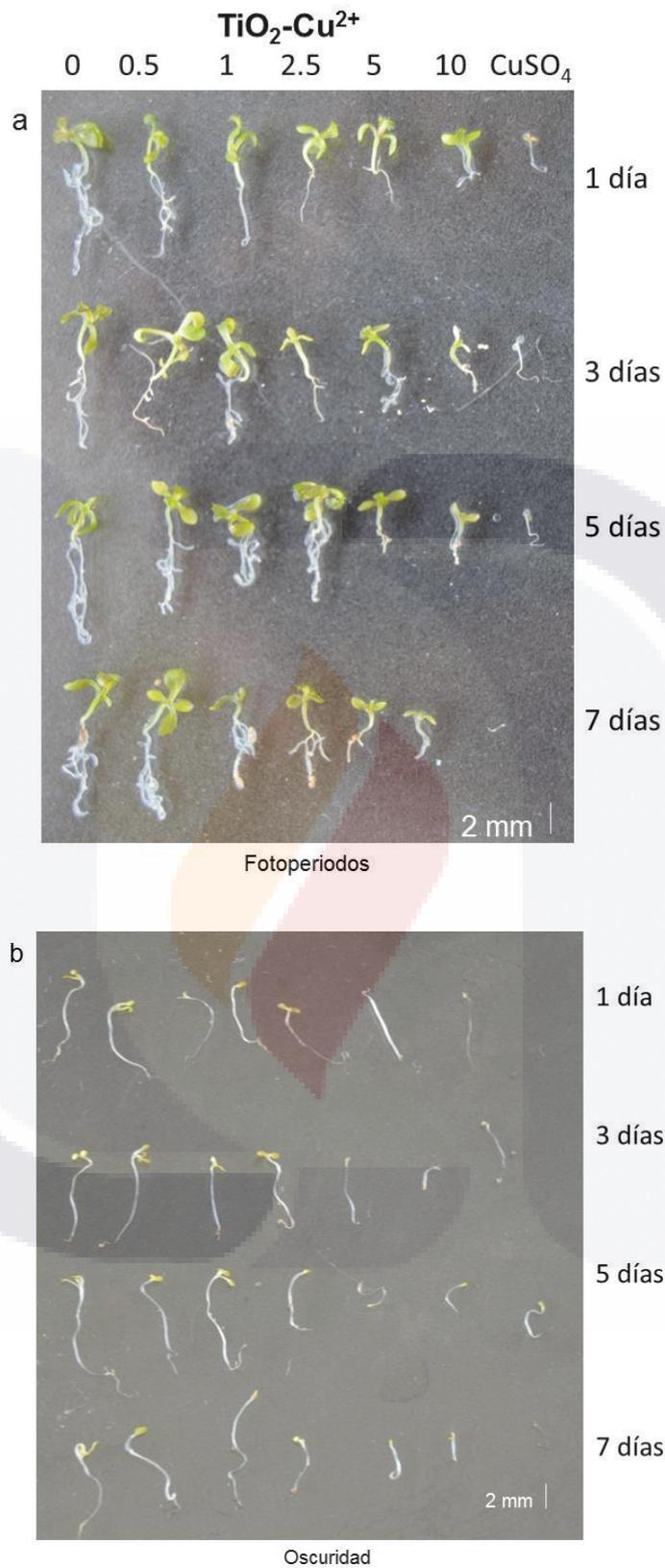


Figura 20. Plántulas de *A. thaliana* expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ durante distintos tiempos Plántulas representativas después de su exposición a concentraciones de 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y CuSO_4 , (a) en fotoperiodos y (b) en la oscuridad, durante 1, 3, 5, 7 días.

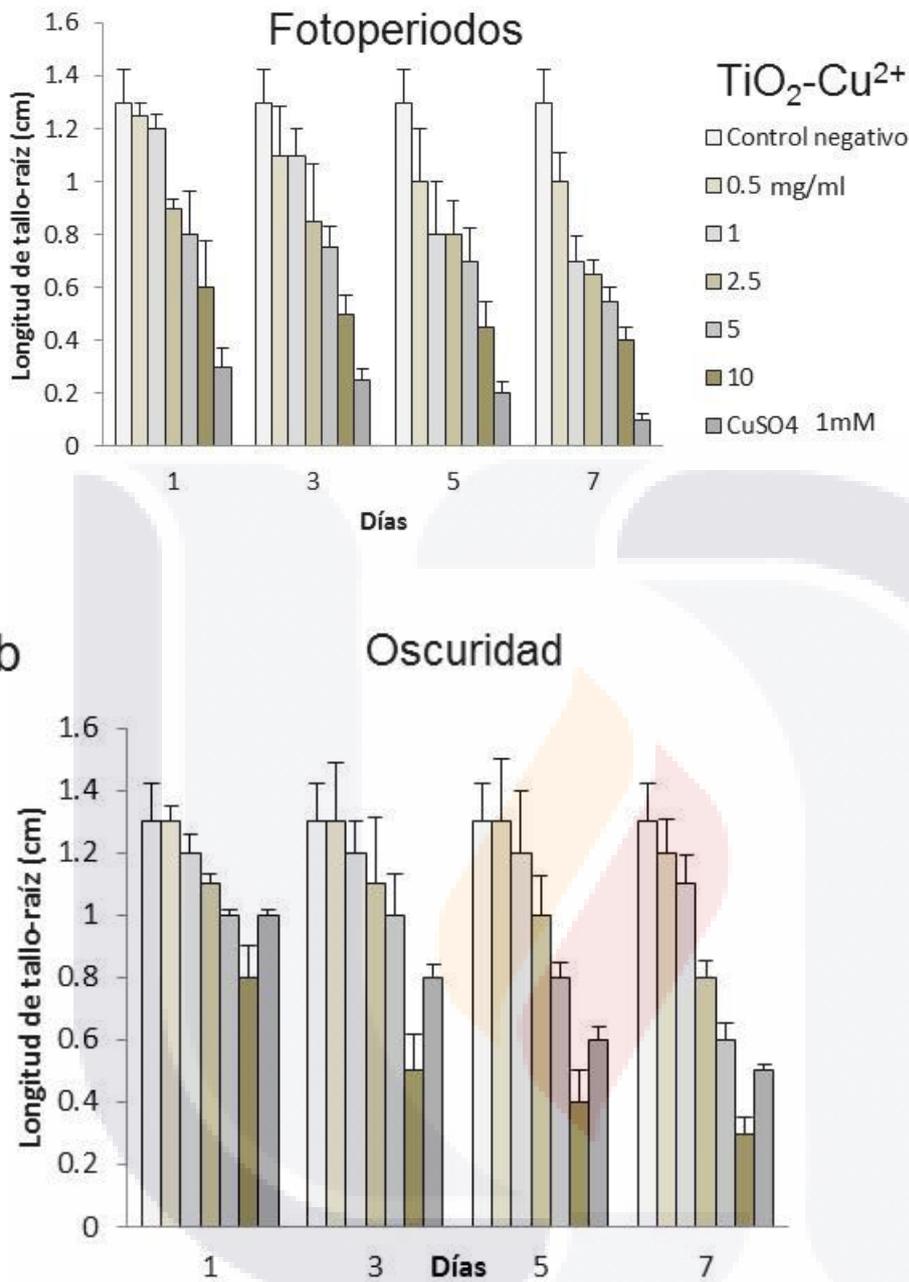


Figura 21. Gráficas de elongación de plántulas de *A. thaliana* expuestas a TiO₂-Cu²⁺ durante distintos tiempos. Medida de plántulas después de exponer a diferentes concentraciones de TiO₂-Cu²⁺ (a) en fotoperiodos y (b) en la oscuridad en distintos tiempos. Las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 10.

Tabla 5. Diferencia porcentual del crecimiento de las plántulas expuestas a los materiales con respecto al control negativo.

	Fotoperiodos				Oscuridad			
	1 día	3 días	5 días	7 días	1 día	3 días	5 días	7 días
Ag@TiO₂ mg/ml								
0.5	35 ^a	NS	NS	NS	38 ^a	NS	NS	NS
1	45 ^a	NS	NS	NS	77 ^a	NS	NS	NS
2.5	NS	NS	47 ^b	49 ^b	NS	NS	NS	NS
5	62 ^b	76 ^b	81 ^b	84 ^b	NS	31 ^b	38 ^b	46 ^b
10	85 ^b	88 ^b	91 ^b	92 ^b	38 ^b	46 ^b	54 ^b	62 ^b
Ag⁰	NS	62 ^b	87 ^b	90 ^b	NS	NS	62 ^b	91 ^b
TiO₂-Cu²⁺ mg/ml								
0.5	NS							
1	NS	NS	38 ^b	46 ^b	NS	NS	NS	NS
2.5	NS	35 ^b	38 ^b	50 ^b	NS	NS	NS	38 ^b
5	NS	42 ^b	46 ^b	58 ^b	NS	NS	38 ^b	54 ^b
10	54 ^b	62 ^b	65 ^b	69 ^b	38 ^b	62 ^b	69 ^b	77 ^b
CuSO₄	77 ^b	81 ^b	85 ^b	92 ^b	23 ^b	38 ^b	54 ^b	62 ^b

^a Mayor porcentaje de elongación que el control.
^b Menor porcentaje de elongación que el control.
 NS = No se encontraron diferencias significativas con respecto del control.
 Los valores representan el porcentaje de diferencia de crecimiento entre las plántulas del tratamiento y las del control.

6.2.3. Evaluación del crecimiento de plántulas mutantes de *A. thaliana* expuestas a los MNEs

Para investigar la participación de la plata como antagonista del etileno en el efecto estimulante observado al exponer plántulas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂, se analizó y comparó el crecimiento de *A. thaliana* de la cepas silvestre Col 0 y de las mutantes *etr1-1* (Bleecker *et al.*, 1988), *ein2-1* (Guzmán & Ecker, 1990) y *ein 3-1* (Kieber *et al.*, 1993). Se evaluó la respuesta de las plántulas cuando fueron incubadas durante una semana en fotoperiodos y/o en la oscuridad, y la exposición a los MNEs se realizó durante un día. En los resultados, se observó que la cepa silvestre presentó una elongación 43.3% (1.6 ± 0.17 cm) y 73.3% (2.5 ± 0.17 cm) mayor que la de su control negativo, en fotoperiodos y en la oscuridad, respectivamente; las plántulas de las cepas *ein2*, *ein3* y *etr1*, expuestas a Ag@TiO₂ en fotoperiodos y en la oscuridad durante un día presentaron un tamaño similar a su respectivo control negativo (Fig. 22a y 22b).

En otro experimento, se evaluó el efecto de los MNEs en las cepas silvestre y mutantes, para investigar las implicaciones del etileno en el efecto inhibitorio producido por los MNEs. Las semillas de las cuatro cepas, la silvestre, *ein2*, *ein3* y *etr1* de *A. thaliana*, se colocaron en el medio con 1 mg/ml de Ag@TiO₂ y se incubaron en fotoperiodos y/o en oscuridad constante durante una semana, en estas condiciones las plántulas de las cuatro cepas presentaron un crecimiento similar a las de su respectivo control negativo (Fig. 22a, 22b, 24a y 24b).

Por su parte, se investigó el efecto de 2.5 mg/ml TiO₂-Cu²⁺ en fotoperiodos y/oscuridad durante un día y/o una semana, en la cepa silvestre y en las mutantes *etr1*, *ein2* y *ein3* y se comparó su crecimiento. Ninguna de las cepas mostró diferencias significativas con respecto a su control negativo cuando la exposición fue por un día, tanto en fotoperiodos como en la oscuridad (Fig. 22a, 22b y 23b). En cambio, cuando la exposición a 2.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ fue en fotoperiodos por una semana, las plántulas mostraron un menor porcentaje de crecimiento que su respectivo control negativo: las plántulas de la cepa silvestre mostraron un crecimiento 50% menor (0.5 ± 0.1 cm) que su control negativo (1 ± 0.1 cm); la cepa *etr1* 36.6% (0.65 ± 0.2 cm) menor que su control negativo (1 ± 0.2 cm); la cepa *ein2* 35% (1 ± 0.2 cm) menor que su control negativo (1.5 ± 0.27 cm); y la cepa *ein3* 40% (0.8 ± 0.21 cm) que su control negativo (1.3 ± 0.22 cm) (Fig. 22a y 24a). Por su parte, cuando el experimento fue llevado a cabo en la oscuridad, las plántulas también presentaron un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

menor crecimiento: la cepa silvestre un 40% (0.9 ± 0.1 cm) menor que su control (1.5 ± 0.2 cm); la cepa *etr1* 31% (1.1 ± 0.2 cm) menor que su control (1.6 ± 0.2 cm); la cepa *ein2* 38% (0.8 ± 0.2 cm) menor que su control (1.3 ± 0.2 cm); y la cepa *ein3* 40% (1.3 ± 0.2 cm) menor que su control (2 ± 0.2 cm) (Fig. 22b y 24b).



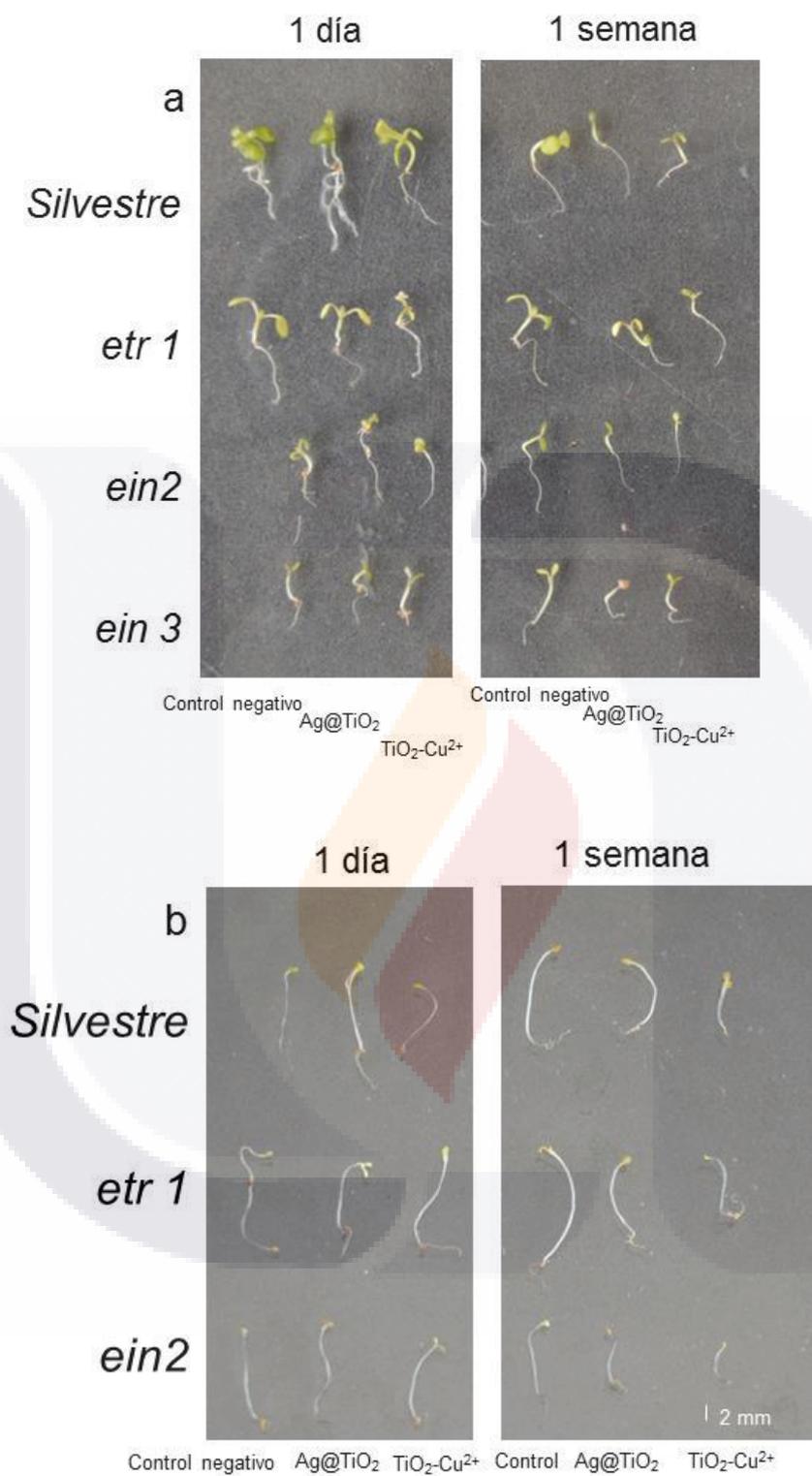


Figura 22. Plántulas de *A. thaliana* silvestre y mutantes insensibles a etileno. Plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂, y 2.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ (a) en fotoperiodos y (b) en la oscuridad durante un día y una semana.

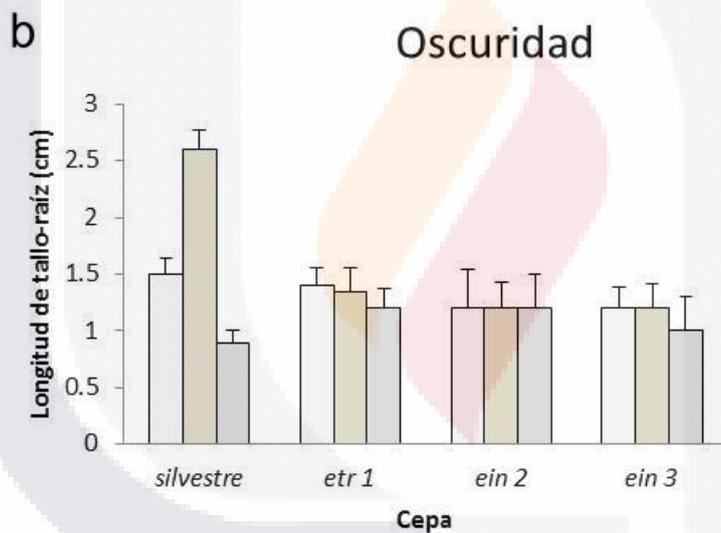
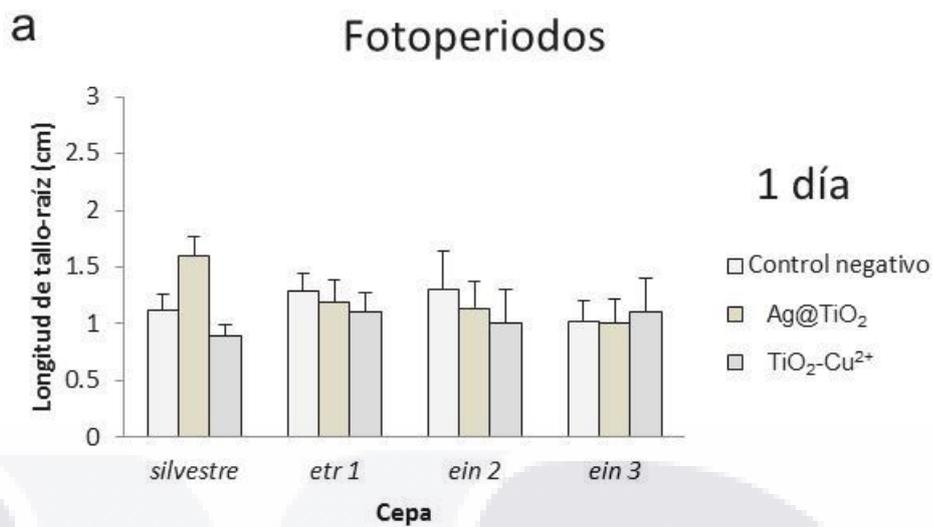


Figura 23. Gráficas de elongación de plántulas de *A. thaliana* mutantes insensibles a etileno y silvestre expuestas un día. Medidas de plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂ y 2.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ (a) en fotoperiodos y (b) en la oscuridad durante un día. Las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 10.

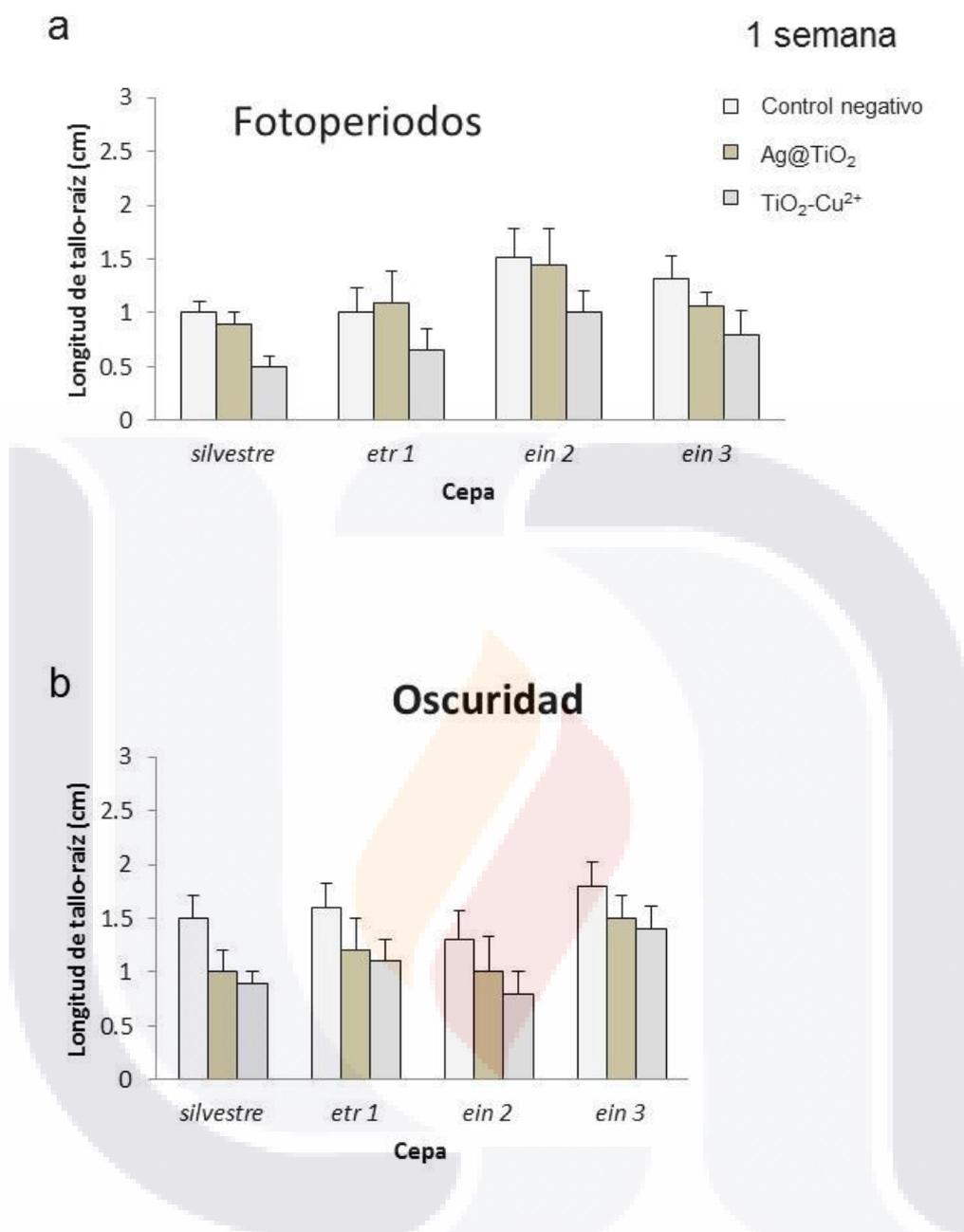


Figura 24. Gráficas de elongación de plántulas de *A. thaliana* mutantes insensibles a etileno y silvestre expuestas una semana. Medidas de plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂ y 2.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ (a) en fotoperiodos y (b) en la oscuridad durante una semana. Las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 10.

6.2.4. Evaluación del crecimiento de plántulas en presencia de Ag@TiO₂ y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

Para evaluar la participación del etileno en el efecto estimulante observado en las plántulas expuestas a Ag@TiO₂, un grupo de plántulas se trataron con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) junto con este material y otro grupo sólo con ACC. En los resultados se observó que las plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂ bajo luz continua durante un día, presentaron una elongación 40% mayor (1.4 ± 0.1 cm) que el control negativo (1 ± 0.04 cm), mientras que las plántulas expuestas a ACC por un día, presentaron una elongación 58.6% menor con 10 μ M (0.41 ± 0.04 cm) y 72.2% menor con 50 μ M (0.28 ± 0.04 cm) que el control negativo. Por su parte, las plántulas que se incubaron con ambos, 1 mg/ml de Ag@TiO₂ más ACC, mostraron un crecimiento similar (0.83 ± 0.16 cm) con 10 μ M y 48% menor (0.51 ± 0.11 cm) con 50 μ M a las del control negativo (Fig. 25 y 26).



Figura 25. Plántulas de *A. thaliana* tratadas con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y Ag@TiO₂. Plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂ mostraron una mayor elongación; el efecto no se observó cuando las plántulas se expusieron a Ag@TiO₂ en combinación con 10 µM y 50 µM de ACC.

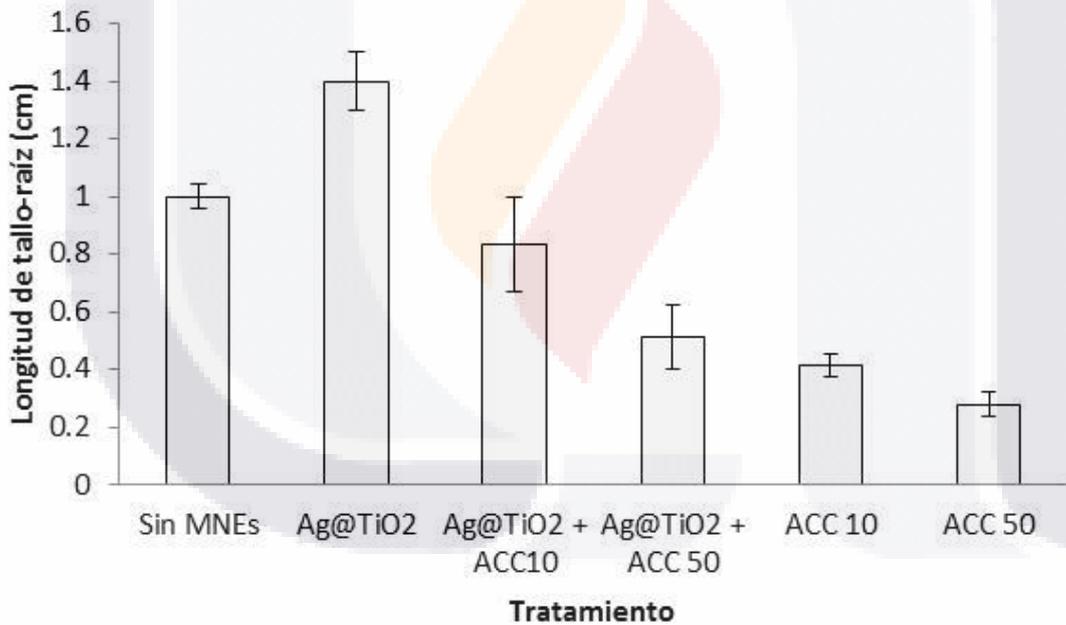


Figura 26. Gráficas de elongación de plántulas de *A. thaliana* expuestas a Ag@TiO₂ en presencia de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. Medidas de plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂ y 10 y 50 µM de ACC. Las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 10.

6.2.5 Evaluación del contenido de clorofila y antocianinas en plántulas expuestas a los MNEs

Se realizó una medición espectrofotométrica del contenido de clorofila en plántulas expuestas a diferentes concentraciones de los MNEs durante un día y una semana, para analizar su efecto en la producción de este pigmento fotosintético. Los resultados mostraron que las plántulas expuestas a 1 mg/ml de MNEs en MS por una semana presentan una mayor producción de clorofila que las plántulas del control negativo, con valores de 1.8 ± 0.3 mg/g de tejido con Ag@TiO_2 , 1.6 ± 0.06 mg/g con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, y 1 ± 0.2 mg/g sin MNEs (Tabla 6). Sin embargo, las plántulas expuestas a 2.5 mg/ml de MNEs por una semana mostraron un menor contenido de clorofila total, con valores de 0.36 ± 0.02 mg/g de tejido (Tabla 6). Las plántulas expuestas a plata coloidal por una semana, presentaron un contenido de clorofila de 0.69 ± 0.15 mg/g y con CuSO_4 de 0.01 ± 0.001 mg/g (Tabla 6). Por su parte, las plántulas expuestas a los MNEs por un día, no mostraron diferencias significativas en el contenido de clorofila, obteniendo valores de 1.37 ± 0.37 mg/g con 1 mg/ml de Ag@TiO_2 , de 1.44 ± 0.37 mg/g con 1 mg/ml of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, de 1.26 ± 0.24 mg/g con Ag^0 , y de 1.17 ± 0.35 mg/g sin MNEs (Tabla 6). En plántulas expuestas a 5 mg/mg MNEs por un día, se encontraron valores de 0.52 ± 0.07 mg/g con Ag@TiO_2 , de 0.44 ± 0.15 mg/g con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y de 0.34 ± 0.02 mg/g con CuSO_4 (Tabla 6).

Por otra parte, se cuantificó el contenido de antocianinas en plántulas expuestas a diferentes concentraciones de los MNEs durante un día y una semana. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Las plántulas expuestas a concentraciones de 0.5 y 1 mg/ml de ambos MNEs, no mostraron diferencias significativas en el contenido de antocianinas con respecto a las plántulas del control negativo, ni con un día ni con una semana de exposición. Se obtuvieron valores de 1.47 ± 0.39 Unidades Relativas de Antocianinas por gramo de tejido (URA/g) en las plántulas del control negativo, 1.3 ± 0.1 URA/g con 0.5 mg/ml of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, y de 1.43 ± 0.3 URA/g con 0.5 mg/ml of Ag@TiO_2 (Tabla 6). Sin embargo, en las plántulas expuestas a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/ml de ambos MNEs, en ambos tiempos, el contenido de antocianinas fue mayor que los controles negativos, con valores de 4.42 ± 0.32 URA/g con 2.5 mg/ml de Ag@TiO_2 (Tabla 6). Por su parte, en plántulas expuestas a los MNEs por 1 día, el contenido de antocianinas fue significativamente mayor que en las plántulas del control negativo, con valores de 0.67 ± 0.15 URA/g sin MNEs, de 1.4 ± 0.05 URA/g con 5 mg/ml of Ag@TiO_2 , y de 1.2 ± 0.2 URA/g con 2.5 mg/ml of $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ (Tabla 6).

Tabla 6. Cuantificación de clorofila y antocianinas en plántulas de *A. thaliana*

mg/ml	Un día de exposición	Una semana de exposición	Un día de exposición	Una semana de exposición
Ag@TiO₂	Clorofila total (mg/g)		Antocianinas (URA/g)	
Control (-)	1.17 ± 0.35	1.03 ± 0.25	0.67 ± 0.15	1.47 ± 0.39
0.5	1.45 ± 0.06	1.46 ± 0.13 ^a	0.66 ± 0.10	1.43 ± 0.20
1	1.37 ± 0.37	1.80 ± 0.30 ^a	0.65 ± 0.20	1.37 ± 0.28
2.5	0.82 ± 0.11 ^b	0.36 ± 0.02 ^b	1.01 ± 0.41 ^a	4.42 ± 0.32 ^a
5	0.59 ± 0.32 ^b	0.30 ± 0.05 ^b	1.42 ± 0.05 ^a	5.91 ± 0.66 ^a
10	0.52 ± 0.07 ^b	0.28 ± 0.03 ^b	1.57 ± 0.83 ^a	6.30 ± 0.86 ^a
0.015 mM Ag⁰	1.26 ± 0.24	0.69 ± 0.15 ^b	0.68 ± 0.07	9.95 ± 0.48 ^a
TiO₂-Cu²⁺				
0.5	1.41 ± 0.71	1.30 ± 0.20	0.68 ± 0.10	1.3 ± 0.1
1	1.44 ± 0.37	1.6 ± 0.06	0.8 ± 0.15	1.71 ± 0.12 ^a
2.5	0.61 ± 0.32 ^b	0.32 ± 0.02	1.27 ± 0.19 ^a	2.01 ± 1.33 ^a
5	0.44 ± 0.15 ^b	0.22 ± 0.06	1.38 ± 0.35 ^a	ND
10	0.41 ± 0.10 ^b	0.1 ± 0.01	1.96 ± 0.62 ^a	ND
1 mM CuSO₄	0.34 ± 0.02 ^b	0.01 ± 0.01	0.71 ± 0.03	ND

^a Contenido de clorofila y/o antocianinas significativamente mayor que el control negativo, $p < 0.05$
^b Contenido de clorofila y/o antocianinas significativamente menor que el control negativo, $p < 0.05$
 ND. No se detectaron los valores.
 Los valores representan la media ± una desviación estándar; n = 3.

6.2.6 Evaluación de la actividad de catalasa en plántulas expuestas a los MNEs

La actividad de catalasa se midió en plántulas de *A. thaliana* de dos días de germinadas expuestas a diferentes concentraciones de los MNEs bajo irradiación de luz visible y en la oscuridad, durante un día, para valorar esta respuesta al estrés. Los resultados muestran que la actividad de catalasa en plántulas expuestas a concentraciones de 0.5, 1 y 2.5 mg/ml de Ag@TiO₂ bajo irradiación por un día, no presentaron diferencias significativas en la actividad de catalasa con respecto al control; sin embargo, las plántulas expuestas a concentraciones de 5 y 10 mg/ml mostraron una actividad de catalasa 104.4% y 160% mayor que las del control negativo (Fig. 27a). En las plántulas tratadas con Ag@TiO₂ en la oscuridad por un día, la actividad de catalasa no mostró diferencias significativas con respecto al control (Fig. 27a). Las plántulas expuestas a Ag⁰ bajo irradiación mostraron una actividad de catalasa (2.9 ± 0.6 U catalasa) 47.6% mayor que la del control, mientras que en la oscuridad no se observaron diferencias significativas (Fig. 27a). Por su parte, las plántulas expuestas a todas las concentraciones evaluadas de TiO₂-Cu²⁺, bajo irradiación y en la oscuridad, mostraron una actividad de catalasa significativamente mayor que las del control negativo, con un incremento porcentual desde 46.2% hasta 169% en la luz, y desde 45% hasta 66.5% en la oscuridad, con 0.5 y 10 mg/ml en la oscuridad, respectivamente (Fig. 27b). En plántulas tratadas con CuSO₄, la actividad de catalasa fue mayor que sus controles negativos, 51.6% bajo irradiación (3 ± 0.5 U catalasa) y 57.4% en la oscuridad (2.6 ± 0.4 U catalasa) (Fig. 27b).

a **Actividad de catalasa en plántulas**

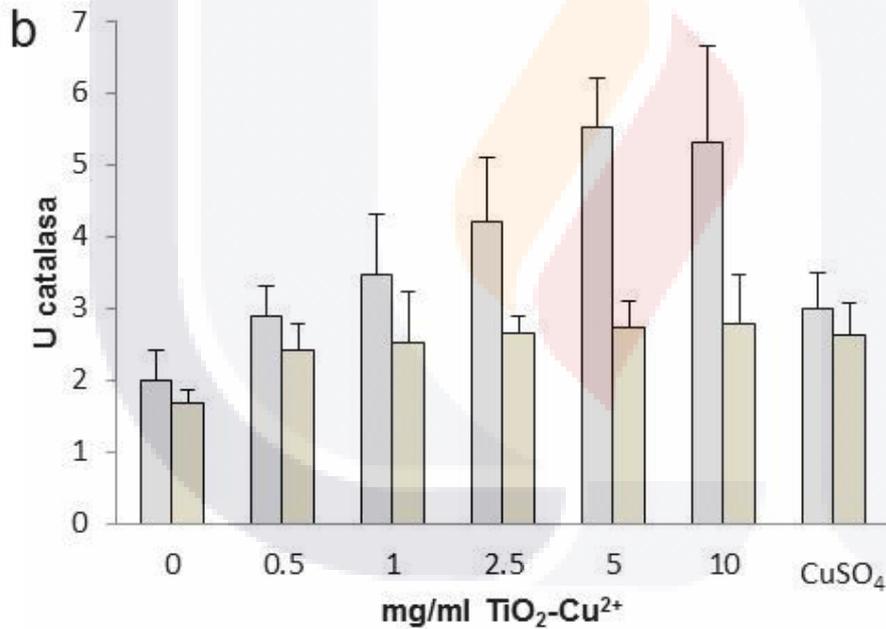
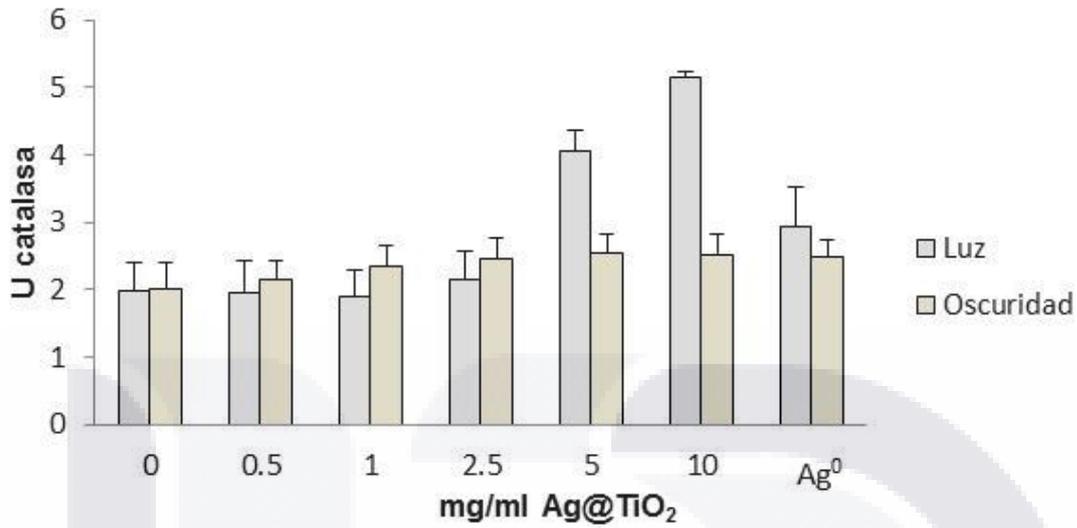


Figura 27. Actividad de catalasa en plántulas de *A. thaliana* expuestas a (a) Ag@TiO₂ y (b) TiO₂-Cu²⁺, bajo irradiación y en la oscuridad durante un día; las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 3.

6.2.7 Evaluación de la expresión genética en plántulas expuestas a los MNEs

La expresión genética se evaluó, mediante técnica de RT-PCR, en plántulas de *A. thaliana* expuestas a 1 mg/ml de los MNEs durante un día. Se analizó la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante, un gen de ascorbato peroxidasa (*APX*) y uno de superóxido dismutasa (*SOD*); la expresión de uno de expansina (*EXP*), proteína involucrada en la expansión de la pared celular vegetal; y la expresión del gen *LEA*, que aumenta su expresión en diversas condiciones de estrés. En los resultados se observó una mayor expresión de *APX* que las plántulas tratadas con 1 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y que las del control negativo (Fig. 28). La expresión de *SOD* también fue mayor en las expuestas a Ag@TiO_2 que en las de los otros tratamientos (Fig. 28). Con los genes *EXP* y *LEA*, no se observó expresión en ninguna de las condiciones (Fig. 28).

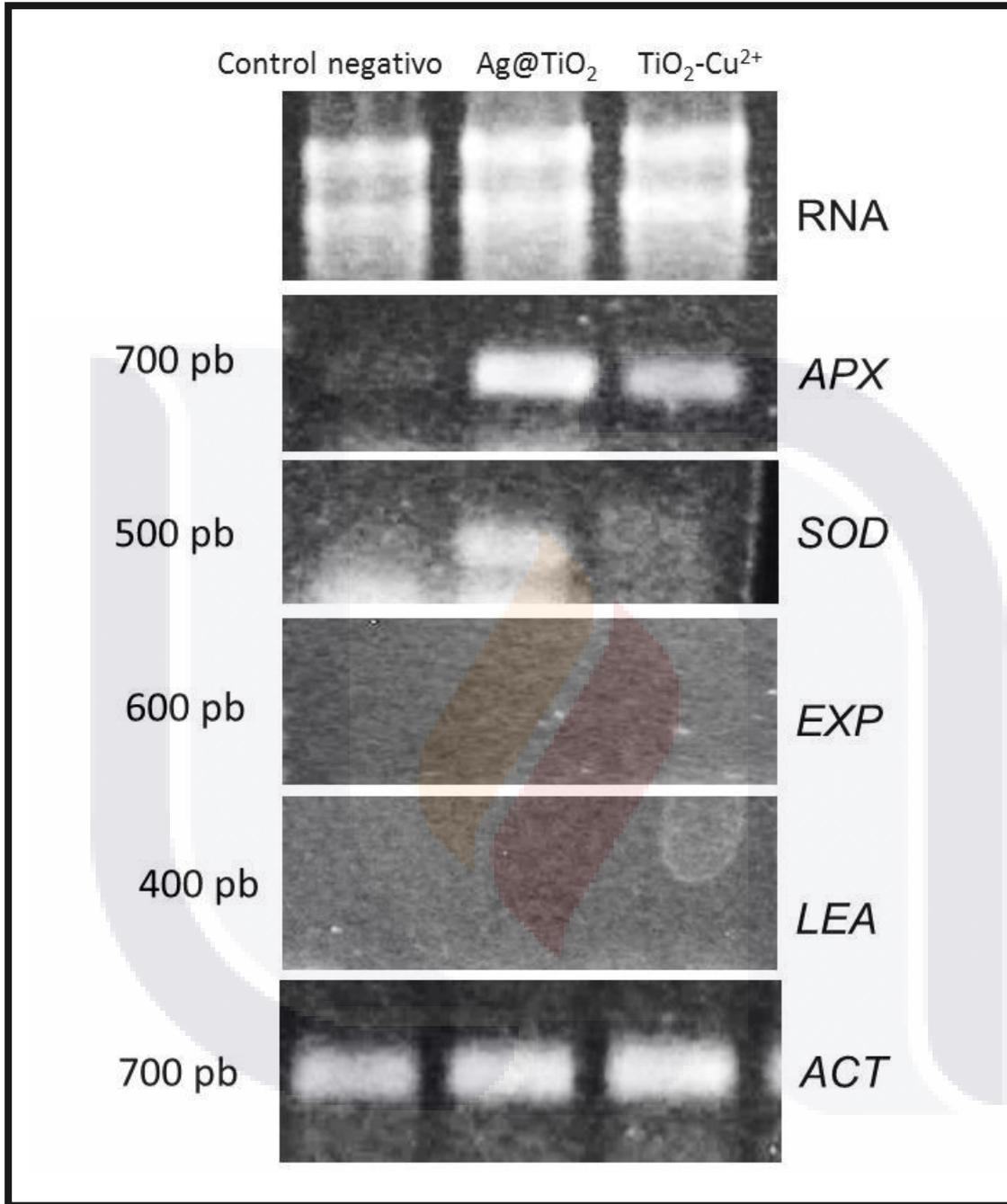


Figura 28. Análisis de expresión en plántulas. Electroforesis de productos de RT-PCR de los genes de actina (*ACT*), ascorbato peroxidasa (*APX*), superóxido dismutasa (*SOD*), expansina (*EXP*) y de las proteínas LEA, siglas de su nombre en inglés Late Embryogenesis Abundant en plántulas de *A. thaliana* (*LEA*).

6.2.8 Cuantificación de plata y cobre en plántulas expuestas a los MNEs y en medios de exposición

Mediante espectroscopía de absorción atómica, se examinó el contenido de plata en plántulas expuestas a Ag@TiO_2 y a plata coloidal, y se determinó el contenido de cobre en las plántulas expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Los valores de la cuantificación se reportan en la Tabla 7. Los resultados demuestran la presencia de plata en las plántulas expuestas a Ag@TiO_2 y a Ag^0 , encontrándose una mayor cantidad de plata en las expuestas a Ag@TiO_2 , 0.23 ± 0.23 y 0.58 ± 0.03 mg de plata/g de tejido de plántulas, que en las expuestas a Ag^0 , 0.12 ± 0.01 y 0.2 ± 0.05 mg/g, después de un día y una semana de exposición en ambos casos (Tabla 7). Por su parte, en todas las plántulas analizadas se encontró cobre, pero en las plántulas expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ se encontró una concentración de cobre mayor que en las plántulas del control negativo: 0.31 ± 0.03 mg/ml en las plántulas expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y 0.13 ± 0.01 mg/ml en las del control, después de un día de exposición (Tabla 7). Las concentraciones de cobre en las plántulas expuestas por un día o por una semana, no mostraron diferencias significativas (Tabla 7).

Los diferentes medios utilizados para exposición de microorganismos y de plantas, también fueron analizados por espectroscopía de absorción atómica. Los resultados muestran que en el medio MS donde se expusieron las plántulas a Ag@TiO_2 por una semana, contienen una mayor cantidad de plata (0.17 ± 0.01 ppm) que el MS donde se expusieron las plántulas a Ag^0 (0.085 ± 0.03 ppm). Por lo contrario, cuando la exposición de las plántulas a estos materiales fue en agua durante una semana, se detectó una mayor cantidad de plata en la de exposición a Ag^0 (0.47 ± 0.01 ppm) que en la de Ag@TiO_2 , donde no se detectó plata (Tabla 7). Por su parte, el medio MS donde se expusieron las plántulas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ durante una semana (3.17 ± 0.148 ppm), presentaron una mayor concentración de cobre que el agua de exposición por una semana (0.08 ± 0.02 ppm) (Tabla 7).

Tabla 7. Cuantificación de cobre y plata por espectrofotometría de absorción atómica.

	Plántulas expuestas en MS por una semana ^a		Plántulas expuestas en H ₂ O por 24 h ^a	
MNEs	[Ag] mg/g	[Cu] mg/g	[Ag] mg/g	[Cu] mg/g
Ag@TiO ₂	0.58 ± 0.03	-	0.23 ± 0.23	-
TiO ₂ -Cu ²⁺	-	0.29 ± 0.06	-	0.31 ± 0.03
Ag ⁰	0.2 ± 0.05	-	0.12 ± 0.01	-
Control (-)	0	0.12 ± 0.016	0	0.13 ± 0.01
	Medio MS por una semana ^b		H ₂ O por una semana ^b	
MNEs	[Ag] ppm	[Cu] ppm	[Ag] ppm	[Cu] ppm
Ag@TiO ₂	0.17 ± 0.01	-	0	-
TiO ₂ -Cu ²⁺	-	3.17 ± 0.148	-	0.08 ± 0.02
Ag ⁰	0.085 ± 0.03	-	0.47 ± 0.01	-
Control (-)	0	0.11 ± 0.05	0	0.04 ± 0.002
	H ₂ O por un día ^b		Buffer de fosfatos pH 5.7 por un día ^b	
MNEs	[Ag] ppm	[Cu] ppm	[Ag] ppm	[Cu] ppm
Ag@TiO ₂	0.06 ± 0.003	-	0.1 ± 0.01	-
TiO ₂ -Cu ²⁺	-	0.25 ± 0.03	-	0.47 ± 0.07
Ag ⁰	0.63 ± 0.02	-	0.25 ± 0.02	-
Control (-)	0	0.11 ± 0.05	0	0.03 ± 0.001
	Buffer de fosfatos pH 7 por un día ^c			
MNEs	[Ag] ppm	[Cu] ppm		
Ag@TiO ₂	0.16 ± 0.02	-		
TiO ₂ -Cu ²⁺	-	0.5 ± 0.01		
Ag ⁰	0.2 ± 0.04	-		
Control (-)	0	0.1 ± 0.03		

^a Plántulas tratadas., ^b Medio de exposición de plántulas,

^c Medios de exposición de microorganismos con 1 mg/ml de Ag@TiO₂, 1 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ y 0.015 mM Ag⁰. Los valores representan la media ± una desviación estándar; n = 3.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6.2.9 Observación por Microscopía Electrónica de Barrido de plántulas expuestas a los MNEs

Las plántulas de *A. thaliana* expuesta a los MNEs fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido, para observar la presencia de estos materiales. Las plántulas expuestas a Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ muestran una gran cantidad de partículas adheridas a la superficie, lo que no fue tan evidente en las del control negativo (Fig. 29).



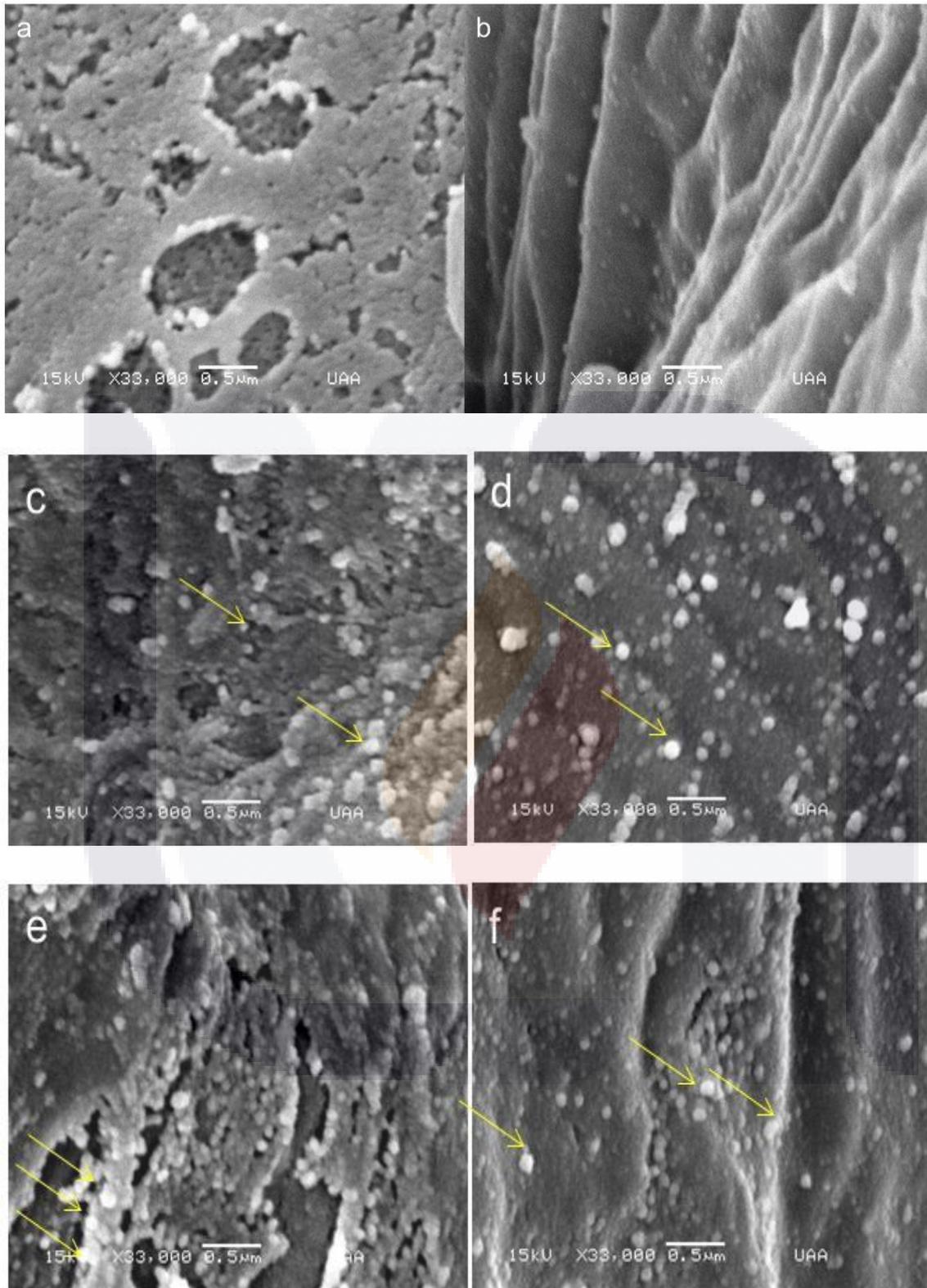


Figura 29. Fotografías de microscopía electrónica de barrido. Plántulas (a, b) del control negativo, (c, d) expuestas a Ag@TiO_2 , (e, f) expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Las flechas indican posibles aglomerados de los MNEs.

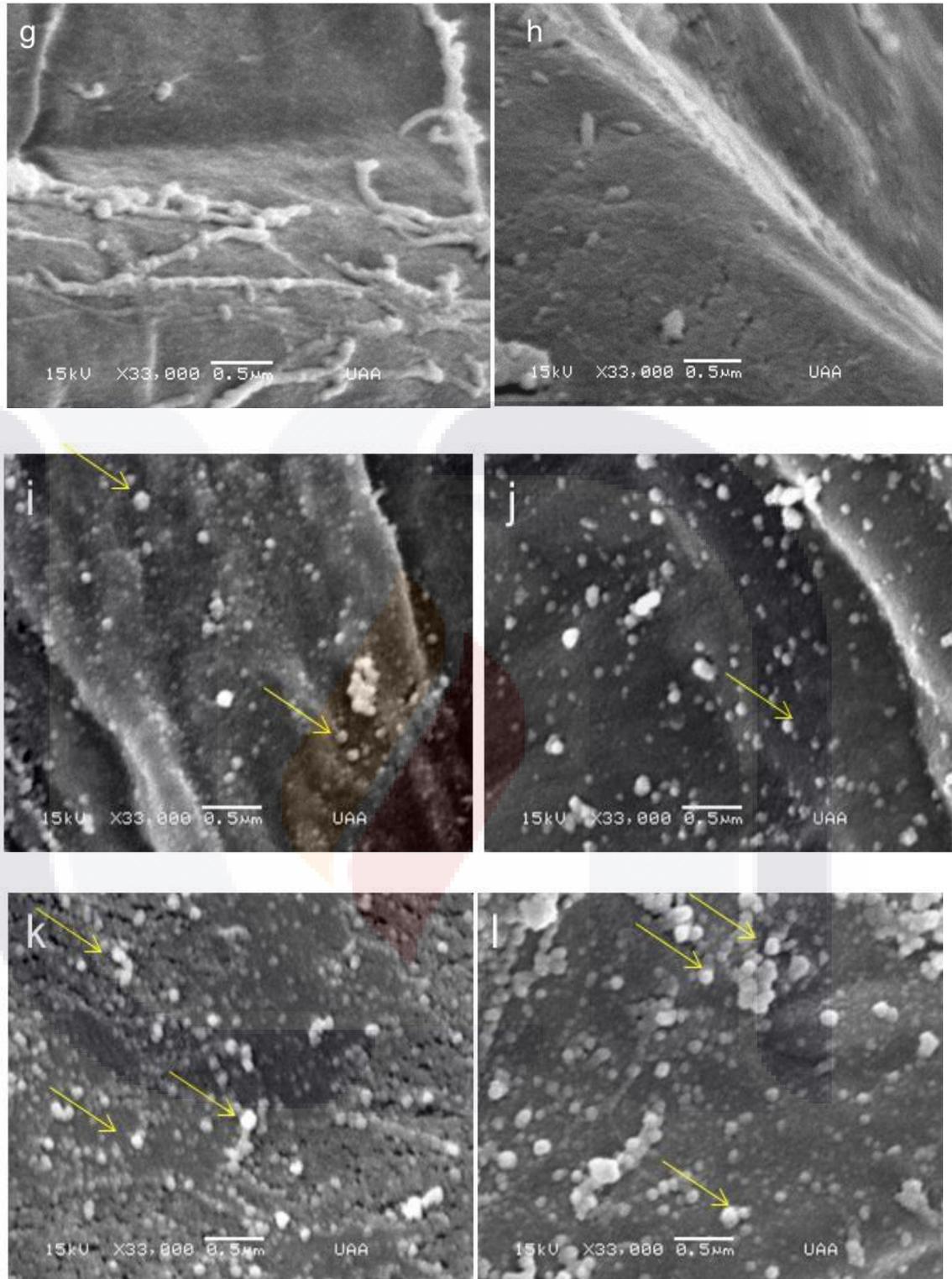


Figura 29. Fotografías de microscopía electrónica de barrido. Plántulas (g, h) del control negativo; (i, j) expuestas a Ag@TiO_2 , (k, l) expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Las flechas indican posibles aglomerados de los MNEs.

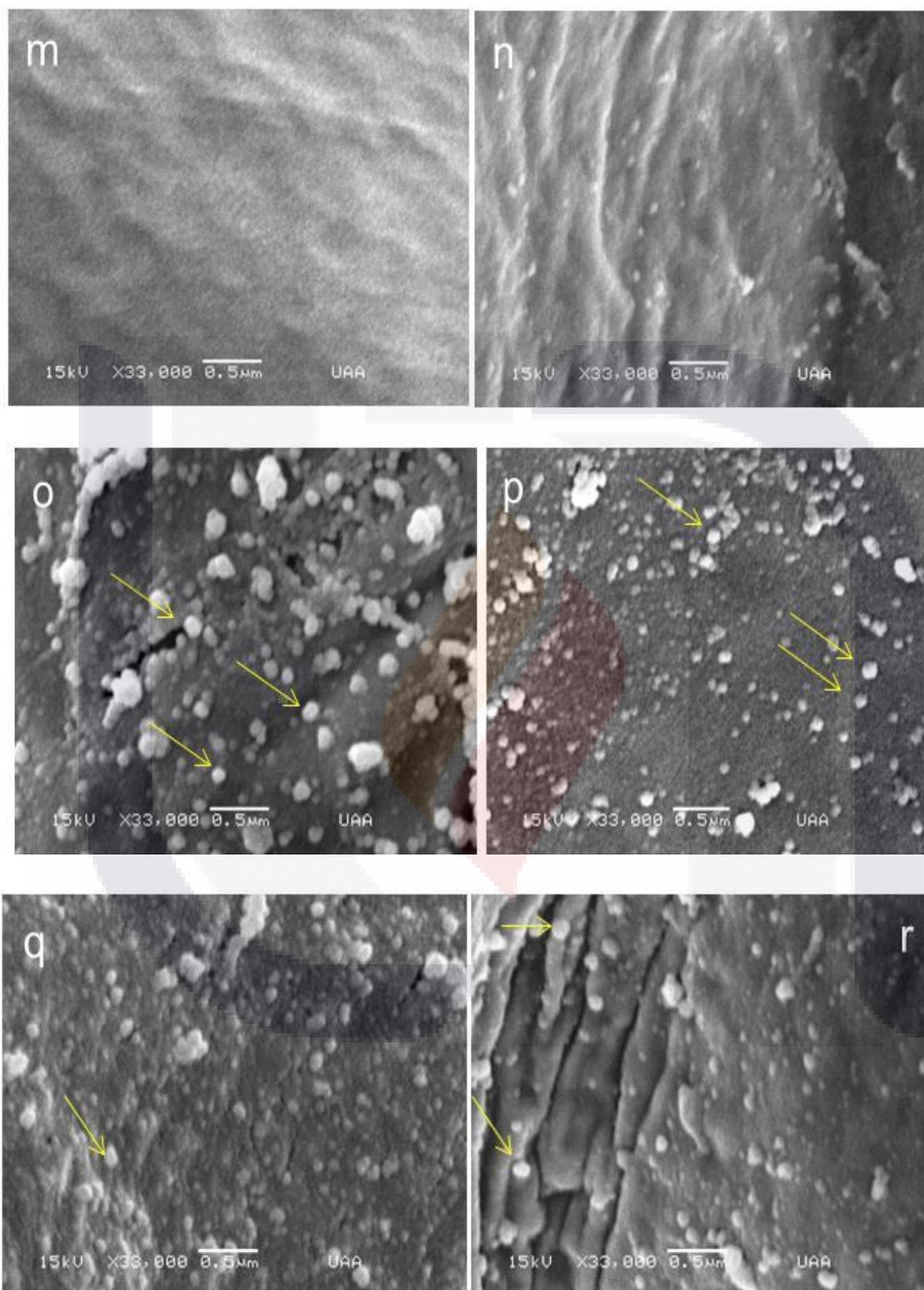


Figura 29. Fotografías de microscopía electrónica de barrido. Plántulas (m, n) del control negativo, (o, p) expuestas a $Ag@TiO_2$, (q, r) expuestas a TiO_2-Cu^{2+} . Las flechas indican posibles aglomerados de los MNEs.

6.3 Evaluación de los efectos en cultivos de células vegetales producidos por la interacción con los MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺

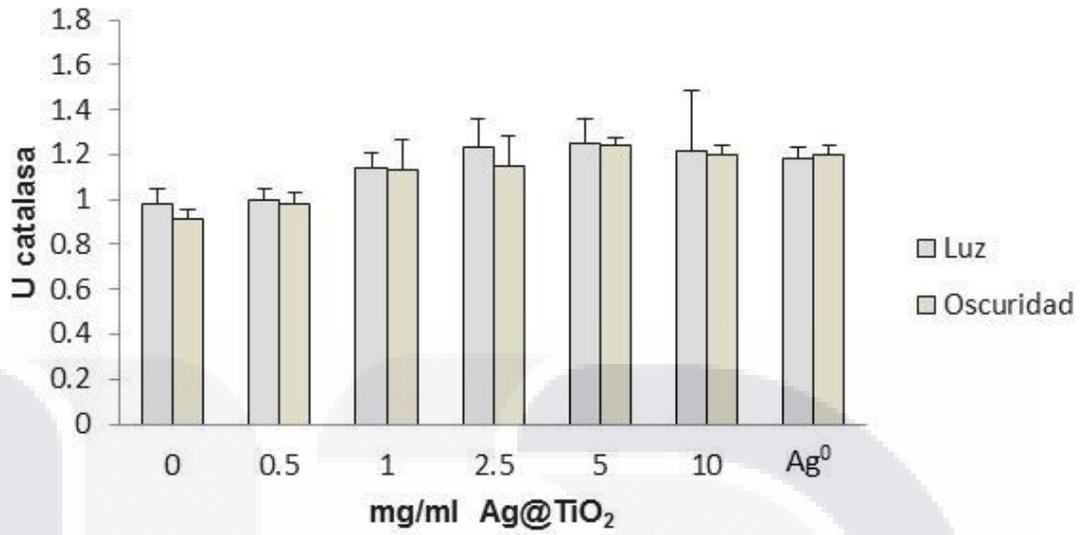
6.3.1 Evaluación de la actividad de catalasa en cultivos de células vegetales expuestos a los MNEs

Se evaluó la actividad de catalasa en cultivos de células vegetales en suspensión, expuestos a diferentes concentraciones de los MNEs, bajo irradiación y en la oscuridad, durante un día. Los resultados muestran que no hay diferencias significativa entre la actividad de catalasa en los cultivos de células vegetales expuestos a 0.5 mg/ml de Ag@TiO₂ bajo irradiación y los del control negativo; sin embargo, cuando los cultivos se expusieron a concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml, se observó una actividad de catalasa de 16.3% a 24.8% mayor que el control negativo (Fig. 30a). Por su parte, en los cultivos expuestos a 0.5 mg/ml Ag@TiO₂ en la oscuridad, se observó una actividad de catalasa sin diferencias significativas que la del control; mientras que en los cultivos celulares expuestos a concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml en la oscuridad, la actividad de catalasa (de 1.13 ± 0.12 a 1.20 ± 0.038 U catalasa) fue de 24.2% a 31.7% mayor que la de su control negativo (0.91 ± 0.04 U catalasa) (Fig. 30a). Por otra parte, los cultivos expuestos a Ag⁰ mostraron una actividad de catalasa 20.4 y 30.9% mayor que la observada en el control negativo, bajo irradiación (1.17 ± 0.05 U catalasa) y en la oscuridad (1.19 ± 0.05 U catalasa), respectivamente (Fig. 30a).

Por otra parte, los cultivos celulares expuestos a 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ bajo irradiación durante un día, mostraron una actividad de catalasa de un 36.3 a 49.3% mayor (1.28 ± 0.5 a 1.4 ± 0.22 U catalasa), que la del control negativo (0.9 ± 0.1 U catalasa) (Fig. 30b). Mientras que los cultivos celulares expuestos a 0.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ en la oscuridad, mostraron una actividad de catalasa similar a la de su control negativo (0.9 ± 0.04 U catalasa); en cambio, los cultivos expuestos a 1, 2.5, 5 y 10 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺, presentaron una actividad de catalasa (de 1.08 ± 0.03 a 1.22 ± 0.031 U catalasa) de 1.6% a 31.9% mayor su control negativo (Fig. 30b). Por su parte, la actividad en cultivos celulares expuestos a CuSO₄ mostraron una actividad de catalasa 28.4 y 29.7% (1.3 ± 0.1 y 1.2 ± 0.15 U catalasa) mayor que sus controles negativos, bajo irradiación y en la oscuridad, respectivamente (Fig. 30b).

a

Catalasa en cultivos celulares



b

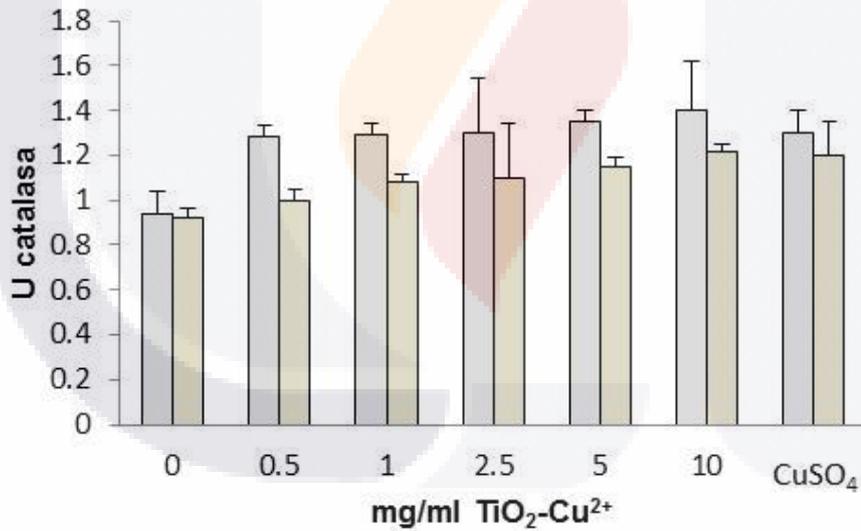


Figura 30. Actividad de catalasa en cultivos de células en suspensión de *A. thaliana* expuestas a (a) Ag@TiO₂ y (b) TiO₂-Cu²⁺, bajo irradiación y en la oscuridad durante 1 día. Las columnas indican la media y las barras ± 1 desviación estándar; n = 3.

6.3.2 Evaluación de la expresión genética en cultivos de células vegetales expuestos a los MNEs

La expresión genética se evaluó, en cultivos de células en suspensión de *A. thaliana* expuestas a 1 mg/ml de los MNEs durante un día. Mediante la técnica de RT-PCR, se analizó la expresión de: un gen de ascorbato peroxidasa (*APX*) y uno de superóxido dismutasa (*SOD*), cuyas enzimas participan en la eliminación de EROs; (c) un gen de expansina (*EXP*), proteína involucrada en la expansión de la pared celular vegetal; y (d) la expresión del gen *lea*, que aumenta su expresión en diversas condiciones de estrés. Los productos de los RT-PCRs se analizaron en geles de agarosa, para hacer una comparación semicuantitativa de la expresión de los genes entre los cultivos expuestos a los MNEs y su control negativo (Fig. 31). En los resultados se observó una expresión similar del gen *APX* en las tres condiciones evaluadas (Fig. 31). La expresión de los genes *SOD* y *EXP* fue mayor en los cultivos tratados con Ag@TiO_2 que los tratados con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y el control negativo (Fig. 31). Mientras que la expresión del gen *LEA* fue más evidente en los cultivos tratados con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ que en los expuestos a Ag@TiO_2 y al control negativo (Fig. 31).

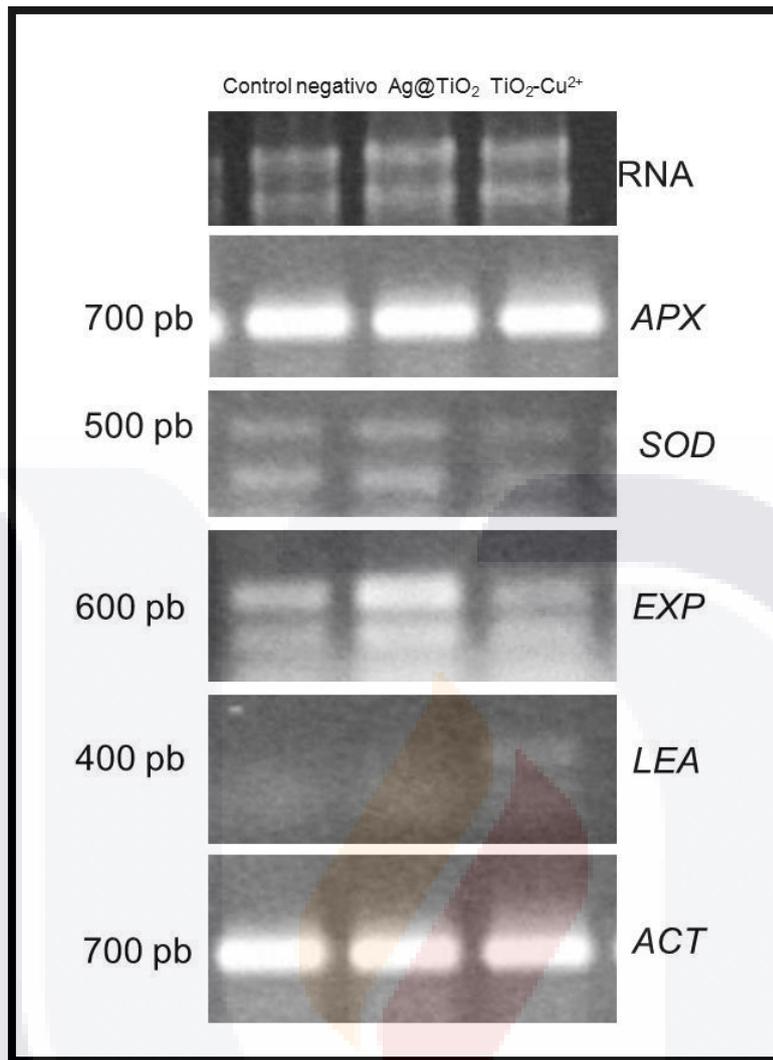


Figura 31. Análisis de expresión genética en cultivos de células vegetales en suspensión. Electroforesis de productos de RT-PCR de los genes de actina (*ACT*), ascorbato peroxidasa (*APX*), superóxido dismutasa (*SOD*), expansina (*EXP*) y del de las proteínas LEA, siglas de su nombre en inglés Late Embryogenesis Abundant (*LEA*) en cultivos de células en suspensión de *A. thaliana*.

7. DISCUSIONES

Los MNEs de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ presentan actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. cerevisiae*. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la inactivación de *E. coli* y *S. cerevisiae* producida por la exposición de los microorganismos a los MNEs de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, tanto bajo irradiación de luz visible como en la oscuridad, durante diferente tiempos. Los resultados obtenidos indican que Ag@TiO_2 presenta una fuerte inactivación de *E. coli* en corto tiempo. Con 10 mg/ml de Ag@TiO_2 , bajo irradiación, se obtuvo una inactivación de la bacteria de 3 U log (99.9 %) en 2 h, con 0.5 mg/ml de 2.2 U log (más del 99%) en 4 h, y con 1 mg/ml de 2.9 U log (casi 99.9%) en 4 h (Fig. 13a). Las diferencias no fueron significativas entre los resultados obtenidos en la luz y en la oscuridad (Fig. 13a y 13b), lo cual indica que el principal mecanismo de inactivación es debido a los iones de plata liberados de Ag@TiO_2 (Yang *et al.*, 2014, Xiu *et al.*, 2012). Los resultados muestran que no hay inactivación de *E. coli* como consecuencia de la irradiación con luz visible, y que la plata coloidal (Ag^0) inactiva a la bacteria más eficientemente, con 6 U log (99.9999%) en 2 h (Fig. 13a.y 13b). Sin embargo, aunque la Ag^0 presentó una inactivación mayor que el Ag@TiO_2 , ambos materiales tienen un eficiente efecto bactericida. Además, Ag@TiO_2 tiene la característica de que la plata puede estarse liberando paulatinamente, provocando que el efecto del MNEs sea más prolongado que el de la Ag^0 (Pan *et al.*, 2010).

Por su parte, *S. cerevisiae* resultó más resistente que *E. coli* a la actividad de Ag@TiO_2 y de plata coloidal (Fig. 13c y 13d). Se requirieron mayores tiempos de exposición al MNEs para alcanzar una adecuada inactivación. Se obtuvo una máxima inactivación de *S. cerevisiae* de 2.6 (más del 99%) con 10 mg/ml bajo luz visible después de 24 h (Fig. 13c). La resistencia observada en las levaduras al efecto de este MNEs puede ser debida a que su célula es más compleja que la de las bacterias, los iones de plata pueden quedar atrapados en los componentes de la pared celular, beta-glucanos, quitina y manoproteínas, y restringir el paso del metal al interior de la célula en ese microorganismo (Dorobantu *et al.*, 2015). Sin embargo, este mecanismo tiene un límite, y a concentraciones elevadas de plata, se pueden presentar los efectos tóxicos. Las levaduras tienen otros mecanismos para resistir los efectos de los metales, que incluyen proteínas que secuestran al metal y sistemas de expulsión que llevan al metal fuera de la célula. Además, la levadura tiene la capacidad de generar

resistencia, activando sus sistemas de detoxificación. La presencia de iones Ag^+ activa al factor de transcripción ACE1 que induce los genes *CUP1* y *CUP2* que codifican para metalotioneínas, aumentando la síntesis de estas proteínas quelantes (Cyret & Philpott, 2013). En la levadura se observó una mayor inactivación con 10 mg/ml de Ag@TiO_2 , bajo irradiación que en la oscuridad (1.9 U log) después de 24 h (Fig. 13d); efecto producido por el sinergismo de la actividad fotocatalítica de Ag@TiO_2 , más la actividad de la plata proveniente del material, independiente de la luz, generación de EROs, asociación a proteínas por desplazamiento de otro metal restándole funcionalidad asociadas al daño del microorganismo (Wilker *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013).

La actividad antibacteriana de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ fue evaluada bajo las mismas condiciones reportadas para Ag@TiO_2 . Sin embargo, $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ no mostró actividad contra *E. coli*, aún a la más alta concentración evaluada (10 mg/ml) (Fig. 13e). Como fue observado con Ag@TiO_2 , la actividad depende de la cantidad de iones en solución, lo que parece indicar que la cantidad de Cu^{2+} liberados de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ no fue suficiente para producir inactivación (Yang *et al.*, 2014; Gogos *et al.*, 2012). La inactivación de *E. coli* producida por el sulfato de cobre fue menor que la obtenida con plata coloidal (Fig. 13e), corroborando que se requieren altas concentraciones de este ion para tener una efectiva actividad antimicrobiana. Las muestras expuestas en la oscuridad, tampoco mostraron inactivación de *E. coli*. En investigación de Wu *et al.* (2010) con 2 mg/L $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, reportan una actividad antibacteriana contra *Mycobacterium smegmatis*, con mejores resultados con un dopaje de 1.8% que con 0.6%. Sin embargo, ese análisis fue realizado mediante monitoreo de densidad óptica, y lo que se observa en sus resultados, es que después de una exposición de 20 h la densidad microbiana se mantiene igual, es decir, se inhibe la reproducción, pero no totalmente. La actividad del $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ parece ser bacteriostático y no bactericida, y es atribuida al sinergismo del $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y del cobre proveniente de los MNEs (Wu *et al.*, 2010). Los resultados de nuestro trabajo pueden ser coincidentes con ese reporte, en el sentido que el $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ tiene un dopaje del 1%, que podría ser bajo considerando que parte del efecto antimicrobiano es por la actividad del cobre libre. Por otra parte, estos investigadores observaron que *Shewanella oneidensis* no se inhibe con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, de ninguno de los dopajes evaluados, porque encontraron que *S. oneidensis* (bacteria Gram (-)), a diferencia de *M. smegmatis* (bacteria Gram (+)), libera al medio una gran cantidad de proteínas, que funcionan como barrera protectora de la acción de los MNEs y reducen al cobre, haciéndolo menos disponible (Wu *et al.*, 2010). Aunque existen varios

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mecanismos de toxicidad del cobre a las bacterias, entre los que destacan la formación de radicales $\bullet\text{OH}$ en reacción tipo Fenton que produce oxidación en proteínas y lípidos; la reacción del cobre con grupos sulfhidrilo de proteínas para producir H_2O_2 ; y el desplazamiento de otros metales como Zn y Fe de su lugar en proteínas funcionales inactivándolas; *E. coli* ha desarrollado varios mecanismos de resistencia ante la acción del cobre: secuestro extracelular de los iones, impermeabilidad de las membranas interna y externa, producción de metalotioneínas y bombas de expulsión del exceso de cobre (Grass *et al.*, 2011). En la evaluación de *S. cerevisiae* usando $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, se observó una inactivación máxima 1.9 U log (menos de 99%) con 10 mg/ml después de 24 h (Fig. 13f). Aunque este resultado demuestra actividad de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ contra *S. cerevisiae*, también es claro que es más sensible a Ag@TiO_2 . El cobre participa en varios procesos importantes dentro de la levadura, debido a su poder redox, aunque esto genere EROs, y al igual que en *E. coli*, el cobre compite con otros metales por su sitio en proteínas. Por lo tanto, *S. cerevisiae* también cuenta con un sistema que se activa cuando los niveles de cobre son demasiado elevados, regulado por el factor de transcripción Ace1 se activa la síntesis de metalotioneínas, quelantes del metal, y de Sod1 que protegen a la célula del daño oxidativo (Cyret & Philpott, 2013).

Teniendo en cuenta que se propuso que la actividad antimicrobiana de Ag@TiO_2 es proporcional a la cantidad de Ag^+ liberado al medio (Xiu *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2014), se analizaron los medios de exposición mediante espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados mostraron la presencia de plata a una concentración de 0.16 ± 0.02 ppm en el buffer de fosfatos pH 7 incubado con 1 mg/ml de Ag@TiO_2 , durante un día, mientras que en el buffer incubado con plata coloidal se detectó una concentración de 0.2 ± 0.04 , es decir, un 20% más del metal (Tabla 6). Lo que podría explicar las diferencias encontradas en la actividad antimicrobiana de uno y otro material. Por su parte, en el buffer con 1 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ incubado durante un día, se encontró cobre a una concentración de 0.5 ± 0.01 ppm, mientras que en el control negativo 0.1 ± 0.03 ppm (Tabla 6). Aunque la cantidad de Cu^{2+} en el medio es mayor que el de Ag^+ , la plata tiene una mayor actividad antimicrobiana.

El tratamiento de semillas con Ag@TiO_2 y de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ para su desinfección es inadecuado para su cultivo *in vitro*. Se realizaron varios experimento para evaluar Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ para su uso de desinfectantes de

semillas para su cultivo en condiciones axénicas. Las semillas de *A. thaliana* se trataron con 10 mg/ml de estos MNEs durante 24 h, y entonces se sembraron en medio MS sólido. Los resultados indican que no se consiguió una completa desinfección con estos tratamientos, Ag@TiO₂ 73 ± 1.2 % de desinfección, TiO₂-Cu²⁺ 36 ± 0.8% de desinfección, control negativo 41 ± 11 % de desinfección (Fig. 14a). Aunque sí se observó una inhibición microbiana, las semillas tratadas con MNEs mostraron un desarrollo de microorganismos de menor diámetro, la actividad de los MNEs es insuficiente para su cultivo *in vitro* (Fig. 14a). Es importante resaltar que los MNEs muestran una buena actividad antimicrobiana cuando son evaluados con cultivos monoxénicos (*E. coli* o *S. cerevisiae*), sin embargo cuando un consorcio de microorganismos es expuesto a los MNEs, la actividad parece verse disminuida. Se ha observado que cuando varias especies de microorganismos viven juntas, tienen mayores posibilidades de sobrevivir a condiciones adversas, tales como a altas concentraciones de metales. Esto se consigue porque entre las especies de microorganismos que coexisten, puede haber varios mecanismos de resistencia que benefician a otras especies. Hay varias estrategias que puede tener alguna especie del consorcio que beneficia a las otras especies: reducir u oxidar al ion metálico, convirtiéndolo en una forma menos biodisponible; fijar al ion metálico en su superficie, evitando que alcance a otros microorganismos; bioacumular el metal dentro de la célula, pero atrapándolo con una proteína quelante o dentro de una vacuola; precipitar a los metales en forma de carbonatos o hidróxidos (Sharma, 2015).

Los MNEs de Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺ presentan una actividad moderada contra hongos contaminantes de semillas. En otro experimento, dos hongos (*Aspergillus* spp y *Fusarium* spp) que fueron aislados de cultivos *in vitro* de semillas de *A. thaliana* sin desinfectar, se trataron con 10 mg/ml de Ag@TiO₂ y 10 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺, bajo luz visible durante 24 h. Después, 10 µl de esta suspensión se sembraron e incubaron en medio PD sólido. Los resultados mostraron una inhibición radial del crecimiento de los hongos en los grupos tratados con los MNEs (Fig. 14b). La inhibición fue calculada midiendo los diámetros de las colonias para calcular el porcentaje de inhibición radial (%IR). En el caso de *Aspergillus* spp, %IR fue de 35% con Ag@TiO₂ y de 45% con TiO₂-Cu²⁺. Para *Fusarium* spp los valores de %IR fueron de 17% con Ag@TiO₂, y de 34% TiO₂-Cu²⁺. Estos resultados indican que el material de TiO₂-Cu²⁺ tiene mayor actividad que Ag@TiO₂ contra las especies de hongos estudiadas, siendo *Aspergillus* spp más sensible al tratamiento. Kim *et al.* (2012)

reportaron la actividad de varios MNEs de plata contra diferentes hongos patógenos de plantas; observaron una mayor actividad inhibitoria, con una %IR de hasta el 100%, atribuida a la cantidad de metal liberado. Es importante resaltar que los materiales de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ de nuestro estudio, están dopados con una muy baja cantidad de metal (1 mol%), por lo que deben considerarse otros materiales con mayor porcentaje de metal como candidatos para el tratamiento de microorganismos patógenos de plantas. Con esto hemos descartado el uso de estos MNEs como desinfectantes de semillas para su cultivo *in vitro* en condiciones axénicas, pero consideramos que podría usarse para el tratamiento de semillas que van a ser almacenadas e inhibir el desarrollo de contaminantes, sin embargo, esto requiere de la evaluación correspondiente.

La exposición de semillas de *A. thaliana* a Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ no afecta su germinación ni desarrollo. En esta parte del trabajo se investigó el impacto que pudieran tener Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en la germinación y desarrollo de *A. thaliana*. Grupos de semillas de *A. thaliana* fueron expuestas a Ag@TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, Ag^0 y Cu^{2+} , usando como medio de exposición agua destilada o buffer de fosfatos pH 5.7, durante un día, después las semillas fueron colocadas en papel filtro húmedo para observar germinación, y/o en medio MS sólido para observar desarrollo. En los resultados se observó que la interacción de los MNEs con semillas de *A. thaliana* no afectó la germinación (100%) ni su desarrollo (Fig. 15a y 15b). Mediante análisis con microscopio óptico de las semillas, se observaron partículas de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, adheridas a la superficie de la semilla (Fig. 15c). Sin embargo, los resultados indican que esta interacción no interrumpió el flujo de agua al interior de la semilla para que se produjera la germinación. Los MNEs son insolubles en agua y tienden a formar aglomerados en medio acuoso, con radios hidrodinámico de 467 nm para Ag@TiO_2 y de 360 nm para $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en agua destilada (Garcidueñas-Piña *et al.*, 2016), que sin embargo, no afectan la actividad fisiológica de la semilla. Sin embargo, los MNEs son reactivos y se liberan iones metálicos a la solución. Los resultados de absorción atómica muestran que los medios de exposición contienen metales (Tabla 7) proveniente de los MNEs, plata de Ag@TiO_2 , 0.06 ± 0.003 ppm en agua y 0.1 ± 0.008 ppm en buffer de fosfatos pH 5.7; y cobre de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, 0.24 ± 0.03 mg/L en agua y 0.47 ± 0.067 mg/L en buffer de fosfatos pH 5.7. Como se aprecia, las cantidades de metal difieren dependiendo del medio en que se encuentren, al igual que varían los valores de potencial Z. Para Ag@TiO_2 , se reportan valores de -27.83 mV en agua y de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

+81.94 mV en suero fisiológico, y para $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ de +14.73 mV en agua y de +6.85 mV en suero fisiológico (Garcidueñas-Piña *et al.*, 2016). Estos datos explican por qué la cantidad de metal liberado en uno y otro medio es diferente. Sin embargo, en ninguno de los medios se produce toxicidad en semillas de *A. thaliana*. Rette (1999) reportó sus observaciones de germinación en cinco plantas después de ser expuestas a diferentes compuestos de plata, y en la mayoría de los casos hubo una inhibición de la germinación cuando la cantidad de metal en los medios superó las 700 ppm, valor muy por encima de lo encontrado en los medios de exposición con Ag@TiO_2 . Puede inferirse que la testa que protege al embrión de sustancias peligrosas del medio que la rodea, evitó el ingreso de estos materiales, por lo que no se vieron afectados ni la germinación ni el desarrollo. La naturaleza del medio de exposición usado en la evaluación, agua destilada o buffer de fosfatos, no afectó estos eventos.

Formulaciones de plata y cobre son usadas como insecticidas y fungicidas para protección de plantas, aunque el riesgo de estas aplicaciones no ha sido completamente esclarecido (Gogos *et al.*, 2012). En este trabajo se evaluó el efecto de la plata coloidal y del ion Cu^{2+} , considerando que son los metales dopantes de los MNEs en estudio, y que han sido asociados a efectos adversos o de bioacumulación en plantas (Anjum *et al.*, 2013). Así, semillas de *A. thaliana* fueron expuestas a una formulación comercial de plata coloidal (0.015 mM Ag^0) o a una solución de 1 mM CuSO_4 . La interacción de *A. thaliana* con Ag^0 no afectó la germinación ni el desarrollo de las plántulas (Fig. 15b), lo que sugiere que la concentración de iones Ag^+ fue insuficiente para modificar esos eventos aunque la cantidad de plata encontrada en los medios de exposición con plata coloidal, fue diez veces mayor (0.6 ± 0.02 ppm) que la encontrada en el medio con Ag@TiO_2 (Tabla 6). Por su parte, las semillas expuestas a CuSO_4 presentaron una inhibición de la germinación, lo que coincide con los resultados de Ivanova *et al.* (2010), que encontraron que la germinación de *Brassica napus* L puede inhibirse en presencia de 0.3 mM CuSO_4 . Concentraciones ligeramente superiores a la requerida de CuSO_4 (0.0001 mM en el medio MS) producen estrés en las plantas y pueden inhibir la germinación porque afectan el ingreso de agua, el metabolismo y la movilización de sacarosa de reserva (Sethy & Ghosh, 2013).

Las plántulas de *A. thaliana* expuestas a Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ durante una semana presentaron una longitud del tallo y raíz, menor que el control. Considerando que en semillas no se observaron efectos al ser expuestas a los MNE,

fundamentalmente por el efecto protector de la testa de las semillas, en este trabajo se investigó la respuesta de plántulas de *A. thaliana* al ser expuestas a Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺. Esta evaluación se realizó a concentraciones y tiempos variables, para con ello evaluar toxicidad aguda y toxicidad subcrónica. Se evaluó el crecimiento de *A. thaliana* cuando las semillas se desarrollaron a plántulas en dos medios de exposición agua destilada y MS líquido con Ag@TiO₂ y TiO₂-Cu²⁺, durante una semana. Los resultados son presentados en las Figuras 16 y 17. Las plántulas expuestas a Ag@TiO₂ en MS mostraron un crecimiento de 45.2% (2.5 mg/ml) a 55.5% (10 mg/ml) menor que las del control negativo (Fig. 16a y 17a). Las plántulas expuestas a Ag@TiO₂ en agua presentaron un crecimiento de 55.3% (2.5 mg/ml) a 100% (10 mg/ml) menor que las del control negativo (Fig. 16c y 17c).

En tanto que con el otro material, las plántula expuestas a TiO₂-Cu²⁺ en MS (Fig. 16d y 17b) presentaron una elongación de 30.3% (0.6 ± 0.17 cm con 2.5 mg/ml) a 62.4% (0.33 ± 0.09 cm con 10 mg/ml) menor que las del control negativo. Mientras que las expuestas a TiO₂-Cu²⁺ en agua, mostraron un crecimiento de 89.5% (0.11 ± 0.1 cm con 2.5 mg/ml) a 100% menor que las del control negativo. Para averiguar las implicaciones de los metales de los MNEs en los resultados y determinar la translocación de plata y/o cobre al interior de la planta, se realizó un análisis de espectrofotometría de absorción atómica en las plántulas (Tabla 7). En plántulas tratadas con Ag@TiO₂ se encontró un mayor contenido de plata (0.58±.029 mg/g de tejido) que las tratadas con Ag⁰ (0.2 ± 0.05 mg/g de tejido) y que en las del control negativo (0 mg/mg) (Tabla 6), lo que sugiere que el efecto inhibitorio observado está relacionado con la concentración de plata, como lo reportan Wang *et al.* (2013). Aunque la cantidad de plata en los medios con plata coloidal es mayor que en los de Ag@TiO₂, el tamaño de partícula de la plata coloidal es mayor o puede formar aglomerados que precipitar en el medio, reduciendo la biodisponibilidad del metal. En el caso de Ag@TiO₂, nanopartículas de plata están soportadas en una matriz de TiO₂, entonces la liberación de iones Ag⁺ es gradual, resultando en una mayor biodisponibilidad. Las plántulas expuestas a 2.5 mg/ml de Ag@TiO₂ presentaron una menor elongación (0.45 ± 0.14 cm) que las expuestas a plata coloidal (0.61 ± 0.25 cm) (Fig. 17a). Estos resultados sugieren que la inhibición del crecimiento está directamente relacionado con la liberación de los iones Ag⁺, que coincide con otros reportes (Wang *et al.*, 2013) (Fig. 32).

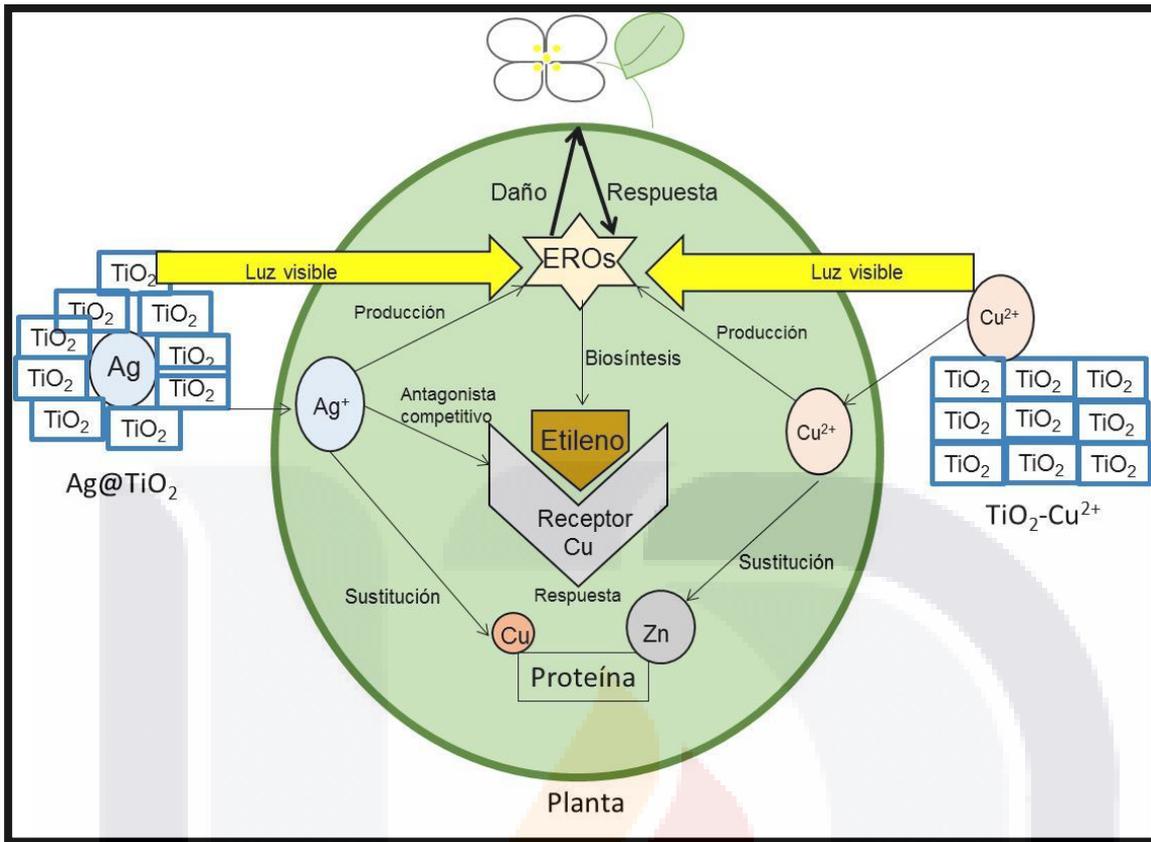


Figura 32. Modelo de acción de los MNEs de $Ag@TiO_2$ y TiO_2-Cu^{2+} . Los MNEs generan especies reactivas de oxígeno (EROs) al ser irradiados con luz UV. Los iones metálicos (Ag^+ y Cu^{2+}) pueden ser liberados de los MNEs e ingresar a la planta para producir diversos efectos: producir EROs; afectar la actividad de proteínas al sustituir a otros metales que son cofactores; la plata puede antagonizar al etileno en sus receptores. Las EROs pueden producir daño a diversas moléculas celulares, y estimular a la planta para que active diversos mecanismos de defensa, como son antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos; también pueden inducir la síntesis de etileno, que participa en diversos eventos, entre los que se cuentan la protección celular (Elaborado por Garcidueñas-Piña, 2016).

Como ya se mencionó previamente, el cobre es un metal esencial para las plantas, pero debido a sus propiedades redox, este elemento tiene una toxicidad inherente. Por su parte, $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ mostró un efecto inhibitorio a menor concentración en MS que en agua (Fig. 17b). Se determinó la cantidad de cobre en los medios de exposición y en las plántulas expuestas mediante absorción atómica. Se encontró una mayor concentración de cobre en el medio MS que en el agua, mientras que en las plántulas expuestas en MS se encontró una menor cantidad que en las plántulas expuestas en agua (Tabla 7). La presencia de ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA), en el medio MS (37 mg/L) reduce la biodisponibilidad de cobre. El EDTA es adicionado al medio MS para facilitar la solubilidad de sales de hierro (Lincoln and Zeiger, 2010), pero forma complejos más estables con el Cu^{2+} ($\log k_f = 18.8$) que con el Fe^{2+} ($\log k_f = 14.3$), lo que facilita la liberación del metal de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, por lo que se encuentra en mayor cantidad en el medio, pero al estar formando quelatos con el EDTA se reduce la biodisponibilidad. Esto sugiere que el cobre liberado de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ participa en el efecto inhibitorio, lo que coincide con el hecho de que en plántulas expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ se encontró el triple de cobre (0.3 ± 0.03 mg/g) que el cuantificado en la plántulas sin exponer (0.1 ± 0.02 mg/g) (Tabla 5), la concentración de cobre en el medio y dentro de la planta tiende al equilibrio, ya que ingresa a la planta a través de canales iónicos principalmente de Cu^{2+} (ZIP2 y ZIP4) (Peñarrubias *et al.*, 2015). Cabe mencionar que los análisis de las plántulas lavadas tanto con agua como con EDTA, considerando la posibilidad de que el metal pudiera estar adherido a la superficie de la plántula, no mostraron diferencia significativa en el contenido de metales, lo que sugiere que el metal detectado se encontraba en el interior de la plántula y no en su superficie. Además, también se analizaron las soluciones de lavado y no se encontró diferencia significativa entre la concentración de los metales del agua y del EDTA.

Las plántulas de *A. thaliana* expuestas a concentraciones bajas de Ag@TiO_2 bajo irradiación de luz visible durante un día, mostraron un mayor crecimiento. En este experimento, plántulas de dos días de germinadas se expusieron a los MNEs bajo irradiación de luz visible y en la oscuridad durante un día (Fig. 16e, 16f, 16g, 16h, 17a, 17b). Los resultados indican que la interacción de plántulas de *A. thaliana* con Ag@TiO_2 bajo luz visible, favorece la elongación a concentraciones de 0.5, 1 y 2.5 mg/ml, ya que las plántulas expuestas presentaron una longitud de 65.8%, 59.3% y 57% mayor que las del control negativo ($1.3 \text{ cm} \pm 0.3 \text{ cm}$) (Fig. 16e, 17a). Como ya se ha mencionado, debido a la actividad fotocatalítica,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los Ag@TiO₂ generan EROs, y varios estudios han relacionado a las EROs con el efecto estimulante que tienen MNEs en el crecimiento de plantas, se ha reportado que el radical OH• tiene implicaciones en el ablandamiento en la pared celular lo que facilita el alargamiento de la raíz (Kim *et al.*, 2014). Es posible que las EROs generadas por activación de la luz visible de Ag@TiO₂ tenga responsabilidad en la elongación, sin embargo, también podría estar afectando la señalización hormonal, como lo reportan Syu *et al.* (2014) que encuentran que MNEs de plata, inhiben la síntesis de etileno, hormona que disminuye la elongación de la raíz principal, y como lo mencionan Wang *et al.* (2013) es conocido el efecto antagónico de la plata con el etileno. Gholambas *et al.* (2013) reportaron un mayor desarrollo de calabacita debido a la interacción con MNEs de plata. Wang *et al.* (2013) reportaron un efecto estimulante en la elongación de raíz en *A. thaliana* cuando expusieron a bajas concentraciones de MNEs de Ag, mientras que a altas concentraciones se observa un efecto tóxico. Se reporta que con 0.1 ppm de Ag⁺ se produce un aumento en la biomasa de tallo y raíz, mientras que con 1 ppm se presenta un efecto tóxico, a este efecto se le conoce como efecto hormético (Wang *et al.*, 2013). Nuestros resultados se aproximan a este reporte, ya que se calculó mediante espectroscopia de absorción atómica, una concentración de 0.06 ± 0.003 ppm en el medio de exposición con 1 mg/ml de Ag@TiO₂ (Tabla 7), en que se observó un mayor crecimiento del tallo-raíz, mientras que con 10 mg/ml de Ag@TiO₂, se observó este efecto inhibitorio. (Fig. 16e y 17a). Los resultados de la exposición en la oscuridad con Ag@TiO₂, durante un día mostraron un alargamiento sin diferencias significativas con respecto al control (Fig. 16g, 17a), lo que apoya la hipótesis de que la luz visible es un elemento importante en el efecto estimulante.

Por otra parte, en la cuantificación de plata mediante espectrometría de absorción atómica, en el agua de exposición se encontró menor cantidad con Ag@TiO₂ (0.06 ± 0.003 ppm) que con Ag⁰ (0.63 ± 0.02 ppm); sin embargo, en las plantas tratadas con estos MNEs se encontró una mayor cantidad de plata (0.23±0.018 mg/g de tejido) que en las tratadas con Ag⁰ (0.12±0.012 mg/g de tejido) (Tabla 7), lo que sugiere que la incorporación de la plata es facilitada por estos MNEs. Como se mencionó antes, el tamaño de partícula de la plata coloidal es mayor o puede formar aglomerados que precipitan en el medio, reduciendo la biodisponibilidad del metal. Además, en Ag@TiO₂, nanopartículas de plata están soportadas en una matriz de TiO₂, entonces la liberación de iones Ag⁺ es gradual, resultando en una mayor biodisponibilidad. La plata que ingresa a las plantas expuestas a Ag@TiO₂ puede

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tener repercusiones en el alargamiento observado (Fig. 16e, 17a), considerando que la plata antagoniza al etileno en sus receptores (Bakshi *et al.*, 2015) (Fig. 32).

Las plántulas expuestas a bajas concentraciones de Ag@TiO₂ en fotoperiodos y en la oscuridad durante un día, presentaron un mayor crecimiento que el control. En este experimento, se investigó el efecto de los MNEs en *A. thaliana* a diferentes tiempos de exposición (1, 3, 5 y 7 días), comparando la respuesta cuando la exposición se realizó en fotoperiodos (16 luz/8 oscuridad) y en la oscuridad (Fig. 18, 19, 20, 21). En plántulas de dos días de germinadas, desarrolladas y expuestas en fotoperiodos a concentraciones de 0.5 mg/ml de Ag@TiO₂ por un día, se observó una elongación 34.6% a 44.6% mayor que las del control negativo, respectivamente (Fig. 18a, 19a). En la evaluación llevada a cabo en la oscuridad, las plántulas se mantuvieron en la oscuridad durante una semana, y se expusieron a Ag@TiO₂ por un día en la oscuridad (Fig. 18b y 19). Estas plántulas presentaron un comportamiento similar que en fotoperiodos, la elongación de las plántulas expuestas a concentraciones de 0.5 y 1 mg/ml de Ag@TiO₂ en la oscuridad, fue 38.5% y 76.9% mayor que las del control negativo. Como ya se había mencionado, un efecto estimulante similar, se observó cuando las plántulas fueron expuestas a esas concentraciones bajo luz continua durante un día (Fig. 16e y 17a). Estos resultados sugieren que el mecanismo que provoca un aumento en la elongación del tallo raíz, se desencadena de manera eficiente con 16 h de exposición a la luz o con un día. Sin embargo, los resultados en la oscuridad (Fig. 18b y 19b) no coinciden con los realizados previamente (Fig. 16g), donde a diferencia de estos no se observó el efecto estimulante, probablemente porque en aquellos se realizó la exposición en agua, mientras que en estos últimos la exposición fue en medio MS, donde ya habíamos observado una menor toxicidad (Fig. 16a, 16c y 17a); además de que en este caso (Fig. 18b y 19b), las plántulas se mantuvieron en la oscuridad durante todo el desarrollo (una semana), de manera que los eventos fisiológicos que se presentan son diferentes.

Las plántulas expuestas a Ag@TiO₂ en fotoperiodos y en la oscuridad durante un día, presentaron un menor crecimiento que el control a altas concentraciones del MNEs y/o a tiempos prolongados. A diferencia del efecto estimulante observado en las plántulas expuestas a concentraciones bajas (0.5 y 1

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mg/ml) de Ag@TiO₂ por un día de exposición, en las plántulas que se expusieron a 2.5 mg/ml en fotoperiodos por un día, no se observaron diferencias significativas con respecto al control; mientras que a concentraciones de 5 y 10 mg/ml en fotoperiodos por un día, se observó una elongación 61.5% y 84.6% menor que las del control, respectivamente (Fig. 18a y 19a). Por su parte, las plántulas desarrolladas en la oscuridad y expuestas por un día a 2.5 y 5 mg/ml de Ag@TiO₂, no mostraron diferencias significativas con respecto del control, mientras que las expuestas a 10 mg/ml tuvieron un crecimiento 38.5% menor que el control (Fig. 18b y 19b).

En el experimento en que las plántulas se expusieron a Ag@TiO₂ por más tiempo en fotoperiodos, no se observó el efecto estimulante, en algunos casos no se presentaron diferencias significativas con respecto del control negativo, incluso en algunas condiciones se observó un efecto inhibitorio, donde se presentó un crecimiento desde 47.3% hasta 92.3%, menor que el control negativo, con 2.5 mg/ml por 5 días de exposición y 10 mg/ml de Ag@TiO₂ por 7 días de exposición (Fig. 18a y 19a). Resultados similares se obtuvieron cuando el desarrollo de la planta (una semana) y la exposición se realizaron en la oscuridad (Fig. 18b y 19b). A diferencia del efecto estimulante observado en la exposición a concentraciones bajas de Ag@TiO₂ (0.5 y 1 mg/ml) en la oscuridad por un día, en plántulas expuestas por más tiempo, se observaron plántulas que no presentaron diferencias significativas con respecto al control (0.5, 1 y 2.5 mg/ml); mientras que otras mostraron una elongación significativamente menor que las del control negativo, desde 30.8% hasta 61.5% menor que el control, con 5 mg/ml por 3 días y 10 mg/ml por 7 días (Fig. 18b y 19b). Estos resultados muestran como el Ag@TiO₂ tienen efectos estimulantes a bajas concentraciones y por corto tiempo de exposición, pero a medida que se incrementa la concentración del MNEs y el tiempo de exposición, el efecto estimulante se pierde y se produce un efecto inhibitorio. Los resultados coinciden con los mecanismos discutidos antes y observados en otros reportes (Wang *et al.*, 2013) (Fig. 32). Para evaluar el efecto de la plata, se expusieron plántulas a una solución de plata coloidal de un desinfectante comercial (0.015 mM Ag⁰) en MS, tanto en fotoperiodos como en la oscuridad y durante diferentes tiempos. Plántulas expuestas a Ag⁰ por un día, presentaron un crecimiento similar a las del control negativo (Fig. 18a y 19a). Sin embargo, el crecimiento fue 61.5% menor después de 5 días de exposición en la oscuridad, que su control (Fig. 18a, 18b, 19, 19b).

Las plántulas de *A. thaliana* expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ durante un día, mostraron un menor crecimiento. En otro experimento, se expusieron plántulas de dos días de germinadas a diferentes concentraciones de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ bajo irradiación de luz visible y en la oscuridad, por un día (Fig. 16f, 16h, 17b). Los resultados mostraron que mientras las plántulas expuestas a 0.5 mg/ml no presentaron diferencias significativas con respecto del control negativo, las expuestas a concentraciones desde 1 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ bajo irradiación durante un día, presentan un alargamiento 59.3% menor que el control negativo (Fig. 16f y 17b). Se observó una inhibición dependiente de la concentración del material, con un crecimiento de 70.9% menor que el control con 10 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Por su parte, cuando la exposición de las plántulas se llevó en la oscuridad por un día, a concentraciones bajas de 0.5, 1 y 2.5 mg/ml no se observaron diferencias significativas en la elongación con respecto a su control; mientras que a concentraciones de 5 y 10 mg/ml, se observó una elongación 65.3% y 82.6% menor que las del control (Fig. 16h y 17b). Los resultados muestran que la luz visible potencia el efecto de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ sobre *A. thaliana*, posiblemente en esas condiciones se produce un mayor estrés en la planta. Estos resultados pueden ser debidos a la actividad fotocatalítica del material que genera EROs, que son responsables del estrés oxidativo. También, la liberación de iones de Cu^{2+} a la solución es favorecido por la fotoactivación de MNEs (Wang *et al.*, 2013). Reportes previos relacionan el estrés con una mayor producción de etileno, que como ya mencionamos, limita la elongación de la raíz (Salisbury & Ross 1994). Como ya se mencionó, las plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO_2 por un día presentan una mayor elongación, mientras que en las expuestas a 1 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en las mismas condiciones, una menor elongación. Aunque parecen efectos contrarios, efecto benéfico y otro adverso, la explicación de estos fenómenos, puede ser similar, que los iones provenientes de ambos MNEs están produciendo disturbios dentro de la célula vegetal. El Ag^+ del Ag@TiO_2 puede estar desplazando al cobre y al etileno de su receptor, evitando la respuesta normal de etileno, y ocasionando que el crecimiento de la plántula no sea normal, sino mayor. Por su parte, el Cu^{2+} del $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ puede generar EROs, que induce la síntesis de etileno, o desplazando de su sitio al Zn de proteínas funcionales inactivándolas, ocasionando que el tallo y raíz crezcan menos. Se deben considerar las diferencias en la cantidad de iones liberados de su respectivo MNEs: la suspensión con 1 mg/ml de Ag@TiO_2 se encuentran 0.06 ± 0.003 ppm y en la que contiene 1 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ se calcularon 0.025 ± 0.03 ppm (Tabla 7). En plántulas tratadas con 1 mM CuSO_4 , también se observó una menor elongación (Fig. 16f y 16h), que es un efecto conocido desde hace tiempo producido por el exceso de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cobre. El medio MS contiene CuSO_4 a una concentración de 0.0001 mM y se considera tóxico desde concentraciones de 0.1 a 0.5 mM dependiendo de la especie de planta, del estado de desarrollo y de factores ambientales como la disponibilidad de nitrógeno, cuando la planta contiene entre 0.02 y 0.03 mg/g de tejido (Krämer & Clemens, 2005). Aunque el cobre tiene funciones importantes como cofactor de diversas enzimas y proteínas, como la citocromo oxidasa (enzima respiratoria de las mitocondrias), el cobre se vuelve tóxico rápidamente en los cultivos en solución (Salisbury & Ross 1994) por varios mecanismos: quedar unido a los grupos sulfhidrilo de la membrana celular o inducir lipoperoxidación, lo que resulta en la membrana dañada y la producción de radicales libres en diferentes organelos de plantas, y en la menor permeabilidad de las células de la raíz (Emamverdian *et al.*, 2015). Para determinar la cantidad de cobre liberado, se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica, el agua de exposición con 1 mg/ml $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Se encontró una gran cantidad de cobre (0.2 ± 0.03 ppm) en el medio con el MNEs, comparada con la cantidad encontrada en el medio sin MNEs (0.1 ± 0.05 ppm) (Tabla 7), lo cual indica que el cobre fue disociado del MNEs. También se midió el contenido de cobre en plántulas, y se encontró una mayor cantidad de cobre (0.3 ± 0.03 mg/g) en las expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ que las del control negativo (0.1 ± 0.01 mg/g) (Tabla 6), lo que evidencia que el metal debe influir en el efecto observado (Fig. 16f, 16h, 17b) (Fig. 32).

Las plántulas expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en fotoperiodos y en la oscuridad durante diferentes tiempos, presentaron un menor crecimiento que el control. Por otra parte, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en plántulas de *A. thaliana* expuestas en MS líquido en fotoperiodos y en la oscuridad por diferentes tiempos. Los resultados que se presentan en las Figuras 20 y 21 y en la Tabla 5, muestran que en ciertas condiciones no hay diferencias significativas con respecto al control negativo, mientras que en otras se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento de las plántulas dependiente de la concentración de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, y del tiempo de exposición. Las plántulas desarrolladas y expuestas en fotoperiodos, presentaron un crecimiento desde 34.6% hasta 69.2% menor que el control negativo, con 2.5 mg/ml por 3 días de exposición y 10 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y 7 días de exposición (Fig. 20a y 21a y Tabla 5). Los resultados en fotoperiodos, dan una idea del posible comportamiento de los MNEs en condiciones que se aproximan más a los naturales. Por otro lado, en el experimento realizado completamente en la oscuridad se observó un comportamiento similar que en fotoperiodos (Fig. 20a y 21a). Estos

resultados coinciden con los de experimentos discutidos previamente y con otros reportes (Lee *et al.*, 2010). Las plántulas presentaron una elongación desde 38.5% hasta 76.9%, con 10 mg/ml después de 1 y 7 días de exposición en la oscuridad (Fig. 20b y 21b y Tabla 5). Por su parte plántulas expuestas a 1 mM de CuSO₄ mostraron un crecimiento desde 76.9% hasta 92.3% menor que el control, cuando la exposición fue en fotoperiodo de 1 y 7 días respectivamente; mientras que la elongación fue desde 38.5% hasta 61.5% menor que el control cuando el experimento fue en la oscuridad de 3 a 7 días de exposición (Fig. 20a, 20b, 21a y 21b y Tabla 5). La concentración de 1 mM CuSO₄, es una concentración tóxica para la planta.

Las cepas mutantes insensibles a etileno de *A. thaliana* no mostraron el efecto estimulante observado en la cepa silvestre al ser expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂. Para investigar la participación del etileno en el efecto estimulante y/o inhibitorio, se diseñó un experimento en el que se analizó y comparó el crecimiento de tres cepas de *A. thaliana* mutantes insensibles a etileno (Fig. 10) *etr1-1* (Bleecker *et al.*, 1988), *ein2-1* (Guzmán & Ecker 1990) y *ein3-1* (Kieber *et al.*, 1993), con la cepa silvestre Col 0, después de ser expuestas a 1 mg/ml de los MNEs, tanto en fotoperiodos como en la oscuridad, durante un día y/o una semana. Los resultados se presentan en las Figuras 22, 23 y 24. Como se discutió en párrafos anteriores, plántulas de dos días de germinadas expuestas a 1 mg/ml Ag@TiO₂ en fotoperiodos por un día, presentaron una elongación 44.6% mayor que el control negativo (Fig. 22a). En la cepa silvestre, el etileno se une a sus receptores, por ejemplo al ETR1 que se localiza en la membrana del retículo endoplásmico, para desencadenar la respuesta, produciendo plantas con tallo y raíz corto, dependiendo de la cantidad de etileno (Salisbury & Ross, 1994). En presencia de un inhibidor como lo es el ion Ag⁺ (Fig. 10c), la cepa silvestre no responde al etileno y su tallo y raíz crecen largos. Los resultados de la exposición de la cepa silvestre a Ag@TiO₂ sugieren que la plata liberada del MNEs, está antagonizando al etileno en su receptor, produciendo plantas con tallo y raíz largos. Por su parte, las cepas mutantes insensibles a etileno (*ein2*, *ein3* y *etr1*) expuestas a 1 mg/ml Ag@TiO₂ bajo irradiación por un día, presentaron un tamaño similar a su respectivo control negativo (Fig. 22a y 23a). En otro experimento, las plántulas de las cuatro cepas se mantuvieron en la oscuridad durante una semana, y se expusieron a Ag@TiO₂ durante un día. En estas condiciones, las plántulas de la cepa silvestre mostraron un crecimiento 73.3% mayor que su control, mientras que las mutantes insensibles a etileno tuvieron un crecimiento similar a su respectivo control

(Fig. 22b y 23b). La cepa *etr1* tiene una mutación en el gen del receptor ETR1, de manera que el etileno no puede actuar sobre este receptor y la cepa presenta un fenotipo similar en presencia o ausencia de etileno (Bleecker *et al.*, 1988), o si hay un antagonista del etileno como lo es la plata (Binder, 2015), pierde afinidad por éste, de manera que al exponer esta cepa a Ag@TiO_2 , la plata antagoniza el efecto del etileno provocando que el tallo y la raíz crezcan más. Lo mismo ocurre con la cepa *ein2*, que tienen una mutación en el gen que codifica para la proteína intermediaria EIN2, provocando que aunque el etileno se una a su receptor de manera normal, la señalización intracelular se interrumpe, y no se observan los efectos del etileno o de si hay un antagonismo. La cepa *ein3* tiene una mutación en el gen que codifica para el factor EIN3 que participa en la transcripción de genes de respuesta a etileno, de modo que aunque el etileno esté actuando sobre sus receptores o no, la planta se desarrolla como si no hubiera etileno. Los resultados obtenidos, apoyan la hipótesis de que la plata está produciendo un efecto estimulante al antagonizar al etileno, efecto que sólo es evidente en la cepa silvestre y no en las mutantes (Fig. 22a y 22b).

Las plántulas de *A. thaliana* tratadas con ACC y Ag@TiO_2 no muestran el efecto estimulante observado en aquellas tratadas sólo con Ag@TiO_2 . En un experimento diferente, plántulas de la cepa silvestre de dos días de germinadas se expusieron a Ag@TiO_2 y ACC, precursor del etileno (Fig.8). Los resultados se presentan en las Figuras 25 y 26. Como se ha discutido en párrafos anteriores, las plántulas expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO_2 presentan un crecimiento 40% mayor que el control negativo, cuando la exposición es en luz o fotoperiodos por un día. Por su parte, las plántulas expuestas simultáneamente a Ag@TiO_2 y ACC por un día, no mostraron ese efecto estimulante, con 1 mg/ml Ag@TiO_2 y 10 μM de ACC mostraron un crecimiento similar, mientras que con 1 mg/ml Ag@TiO_2 y 50 μM de ACC presentaron un crecimiento 48% menor que el control. Por otra parte, la elongación de las plántulas expuestas sólo a ACC, mostraron un crecimiento menor, 58.6% con 10 μM y 72.2% con 50 μM , que el control negativo (Fig. 25 y 26). Esto coincide con el hecho de que el ACC es precursor del etileno en su ruta de biosíntesis (Fig. 8), entonces al añadirlo al medio, la planta incrementa su producción, y como ya se mencionó, el etileno provoca que el tallo y raíz de la planta crezcan cortos (Salisbury & Ross, 1994). Estos resultados muestran que al incrementar la cantidad de etileno, se revierte el efecto estimulante observado al exponer las plántulas a Ag@TiO_2 , lo que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

apoya la hipótesis de que es la plata la que produce una mayor elongación de la plántula, al antagonizar al etileno en su receptor (Fig. 32).

El efecto inhibitorio observado en la cepa silvestre al ser expuestas a los MNEs en varias condiciones es menor en las cepas mutantes insensibles a etileno de *A. thaliana*. En este experimento, las plántulas de la cepa silvestre y de las mutantes *etr1*, *ein2* y *ein3* se expusieron a 1 mg/ml de Ag@TiO₂ y a 2.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺, bajo irradiación y en la oscuridad, durante una semana. Los resultados se muestran en las Figuras 22 y 24. Las plántulas de las cuatro cepas de *A. thaliana* expuestas a Ag@TiO₂ presentaron un crecimiento similar a las de su respectivo control (Fig. 22a, 22b, 24a, 24b). Por su parte, las plántulas expuestas a 2.5 mg/ml de TiO₂-Cu²⁺ en fotoperiodos por una semana, la cepa silvestre, *etr1*, *ein2* y *ein3* mostraron un crecimiento 50%, 36.6, 35% y 40% menor que su control, respectivamente (Fig. 22a y 24a). En tanto que las plántulas de la cepa silvestre, *etr1*, *ein2* y *ein3* desarrolladas y expuestas a TiO₂-Cu²⁺ en la oscuridad durante una semana, presentaron un crecimiento 40%, 31%, 38% y 40% menor que su control, respectivamente (Fig. 22b y 24b). Como ya se ha mencionado, el etileno provoca que el tallo y raíz crezcan cortos; además, diversas condiciones de estrés abiótico, como la presencia de metales o de EROs provocan una estimulación en su biosíntesis (Keunen *et al.*, 2016) (Fig. 32). Los efectos inhibitorios observados, sugieren que los MNEs incrementan la síntesis de etileno *A. thaliana*, provocando una disminución en la elongación de la plántula. En las cepas mutantes no se observó la respuesta inhibitoria en todas las condiciones en las que se presentó en la cepa silvestre. Las plántulas de las cepas mutantes *etr1* y *ein2* expuestas a 1 mg/ml de Ag@TiO₂ en fotoperiodos durante una semana (Fig. 22b y 24b), y las *etr1*, *ein2* y *ein3* expuestas a 2.5 mg/ml TiO₂-Cu²⁺ en fotoperiodos por un día, tuvieron un crecimiento similar al de su respectivo control negativo (1.5 ± 0.14 cm) (Fig. 22a, 22b, 23a y 23b). Las cepas de *A. thaliana* mutantes de etileno, *etr1*, *ein2*, *ein3*, tienen alterado alguno de los mediadores de la señalización del etileno, de manera que a pesar de la presencia de etileno, la planta es incapaz de responder frente a este, como lo hace la cepa silvestre (Salisbury & Ross, 1994). Estos resultados indican que sí hay implicaciones del etileno en la respuesta inhibitoria (Fig.32). Sin embargo, las cepas mutantes en algunas condiciones de exposición, también mostraron disminución de su crecimiento. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio observado en las plántulas expuestas a los MNEs, no es consecuencia de un único mecanismo, como puede ser el incremento

de la concentración de etileno (Fig. 32). Como ya se ha mencionado, el cobre por su capacidad de oxidarse y reducirse, genera EROs que producen daño a diferentes moléculas biológicas como lípidos y DNA, además de desplazar a otros metales de su unión a proteínas funcionales, inactivándolas, acciones que pueden tener repercusiones en el crecimiento de la planta (Cyret & Philpot, 2013).

El contenido de clorofila se modifica en plántulas expuestas a los MNEs. Se expusieron plántulas de *A. thaliana* a diferentes concentraciones de los MNEs bajo irradiación y en la oscuridad, y mediante espectrofotometría UV-Vis se determinó el contenido de clorofila total. Los resultados se presentan en la Tabla 6. Algunos grupos de plántulas expuestas a ambos MNEs a bajas concentraciones, mostraron un aumento en el contenido de clorofila total. En algunas investigaciones han encontrado que plantas expuestas a MNEs muestran un aumento en el contenido de clorofila (Mizajan *et al.*, 2013). Morteza *et al.* (2013) reportan un incremento de clorofila al exponer plantas de *Zea mays* L a MNEs de TiO_2 , aunque el mecanismo no está completamente esclarecido, suponen que los MNEs podría estar estabilizando la integridad de la membrana del cloroplasto, protegiendo a la clorofila. La clorofila total es la suma de dos tipos de clorofila, clorofila *a* y clorofila *b*. La clorofila *a* absorbe energía a una longitud de onda aproximada de 680 nm y la clorofila *b* de 640 nm, que corresponden a luz violeta, azul, anaranjada y roja. Las clorofilas junto con los carotenoides se encuentran dentro de los tilacoides, en los cloroplastos, son los pigmentos que utilizan la energía de la luz para oxidar H_2O y formar ATP y NADPH, que proporcionan la energía para que las enzimas que se encuentran en el estroma, convierta el CO_2 en carbohidratos, en especial almidón (Salisbury & Ross, 1994). Dada la importancia de la producción de carbohidratos por la planta, un incremento en la cantidad de clorofila puede suponer un mejor desarrollo y productividad de la planta. Por otra parte, en las plántulas expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en agua, durante una semana, se encontró una menor cantidad de clorofila total que con Ag@TiO_2 , Ag^0 y el control sin MNEs (Tabla 6), que puede ser debido a la reducción de biomasa que se observó en esa condición (Fig. 16c y 16d) o a la lipoperoxidación de membranas de cloroplasto como resultado del estrés oxidativo, como lo mencionan Nair & Chung (2014 b) en su estudio con *Oriza sativa* L. La de clorofila se sintetiza a partir del ácido glutámico, que es precursor del ácido δ aminolevulínico que por condensación de dos moléculas forma el porfobilinógeno. El porfobilinógeno entra a una secuencia de reacciones de condensación, deshidratación y descarboxilación para producir la protoporfirina, que

por inclusión de magnesio se forma la protoclorofilida *a*. La protoclorofilida *a*, por acción de la enzima protoclorofilida-óxidorreductasa en presencia de luz y de NADPH se convierte en clorofilida *a*, que en reacciones posteriores pasa a ser clorofila *a* (Redes-García & Collazo-Ortega, 2006). Los MNEs pudieran estar interfiriendo con la síntesis de clorofila en alguno de sus puntos, posiblemente los metales puedan afectar la actividad de alguna de las enzimas que participan en la ruta de síntesis.

El contenido de antocianina se modifica en plántulas expuestas a los MNEs. Para examinar el impacto de los MNEs en *A. thaliana*, se comparó la concentración de antocianinas presentes en plántulas expuestas a diferentes concentraciones de ambos MNEs, bajo irradiación de luz visible y/o en la oscuridad, con los controles negativos. Los resultados se presentan en la Tabla 5. El contenido de antocianina en las plántulas expuestas a bajas concentraciones de ambos MNEs por una semana, no mostraron diferencias significativas en el contenido de antocianinas con respecto a grupo control negativo (Tabla 5). Sin embargo, el contenido de antocianinas se incrementó en plántulas expuestas a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/ml de los MNEs, durante un día y una semana (Tabla 5). Las antocianinas son flavonoides responsables de la coloración de flores y frutos en plantas superiores (Feyssa *et al.*, 2009). Son pigmentos asociados con funciones de protección contra radiación UV, EROs y microorganismos, y la planta aumenta su producción para proteger a la célula (Nair & Chung, 2014 a). Syu *et al.* (2014) observaron un incremento del contenido de antocianinas en *A. thaliana* al exponer a MNEs de Ag, y sugieren que es debido al estrés oxidativo producido por la exposición al metal, probablemente lo que ocurre con los metales de este trabajo (Ag y Cu) que al ser liberados de los MNEs causan estrés oxidativo estimulando la producción de antocianinas (Fig. 32).

La actividad de catalasa es modificada en plántulas expuestas a los MNEs. En otro análisis, se cuantificó la actividad de catalasa, enzima que participa en la dismutación del H₂O₂ para formar H₂O y O₂, considerando que la exposición a los MNEs puede estar propiciando que *A. thaliana* incremente la concentración de EROs. Mediante ensayos de actividad enzimática, se valoró la actividad de catalasa en plántulas expuestas a diferentes concentraciones de los MNEs, tanto bajo irradiación como en la oscuridad. Los resultados se presentan en la Figura 27, y muestran la

actividad de catalasa medida en U de catalasa, que representa la diferencia de concentración de H_2O_2 por minuto por mg de tejido. El H_2O_2 es una molécula que se genera naturalmente durante el metabolismo, en la fotosíntesis o en la respiración, y puede incrementarse su producción en diversas situaciones de estrés, provocando que la célula responda con su maquinaria antioxidante. La catalasa cataliza la conversión del H_2O_2 a agua y O_2 , sin requerir la presencia de un agente reductor, por lo tanto, en situaciones de estrés puede verse incrementada la actividad de esta enzima (Mhamdi *et al.*, 2010). Al no existir valores de referencia en plantas de la actividad de catalasa, ya que estos valores dependen de varios factores entre los que se cuentan la especie, la edad, el tejido, las condiciones de cultivo y la técnica de cuantificación, se optó por comparar la actividad de catalasa en las plántulas expuestas a diferentes concentraciones con el control negativo, que en nuestro caso corresponde al valor normal. Algunos grupos de plantas expuestos a los MNEs no mostraron diferencias significativas con respecto de control, mientras que otros grupos mostraron una actividad significativamente mayor, que corresponde a un incremento porcentual igual o mayor del 30%. La actividad de catalasa en plántulas de *A. thaliana* se incrementó en los grupos expuestos a concentraciones altas de $Ag@TiO_2$, siendo más evidente en los grupos expuestos bajo irradiación que en la oscuridad (Fig. 27a). Las plántulas expuestas a concentraciones de 5 y 10 mg/ml de $Ag@TiO_2$ bajo irradiación, mostraron una actividad de catalasa 104% y 160% mayor que el control (Fig. 27a), lo que indica que la planta está bajo un severo estrés oxidativo. Las plántulas expuestas en la oscuridad no mostraron diferencias significativas (Fig. 27a). Estos resultados sugieren, que la presencia del $Ag@TiO_2$ produce un estrés oxidativo en *A. thaliana*, severo cuando la exposición es bajo irradiación y no en la oscuridad, lo que sugiere un mayor estrés oxidativo en presencia de luz, cuando se produce el efecto fotocatalítico de los MNEs. La irradiación es un factor importante, ya que en esa condición la respuesta de la planta es mayor que en la oscuridad, lo que es consistente con el modelo del mecanismo de acción de estos MNEs (Fig. 32). Sin embargo, los resultados indican que a concentraciones bajas, $Ag@TiO_2$ no produce demasiado estrés en la planta. Estos resultados coinciden con lo reportado en *A. thaliana* expuesta a MNEs de oro, donde observan una actividad enzimática potenciada de manera dependiente de la dosis (Kumar *et al.*, 2013). Considerando la participación de la plata liberada del MNEs, se analizó el efecto de este metal en la actividad de catalasa utilizando un desinfectante comercial. Lo que se observó fue que plántulas expuesta a 0.015 mM Ag^0 , mostraron una actividad de catalasa 47.6% mayor

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que la resultante en los controles negativos (Fig. 27a). Estos resultados muestran la activación de la enzima en la planta, por la presencia de la plata.

Por su parte, en los resultados de la evaluación del efecto de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ en la actividad de catalasa en plántulas de *A. thaliana*. Las plántulas expuestas a concentraciones bajas, desde 0.5 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, mostraron un incremento en la actividad de catalasa, 46.2% bajo irradiación y 45% en la oscuridad, mayor que los controles. Estos resultados muestran la toxicidad relativa de estos MNEs, que aún a concentraciones bajas provocan este mecanismo de defensa en la planta (Fig. 32). Para investigar la participación de ion Cu^{2+} proveniente de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, se analizó la actividad de catalasa en plántulas expuestas a 1 mM CuSO_4 . Se utilizó CuSO_4 porque en esta sal, el cobre se encuentra en como Cu^{2+} al igual que en $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$; y se seleccionó esa concentración por ser alta y asegurar efectos tóxicos. Se observó que la actividad de catalasa en las plántulas expuestas a CuSO_4 está incrementada en un 51.6% bajo irradiación y 57.4% en la oscuridad, con respecto a su control (Fig. 27b). Lo que muestra la respuesta de la planta ante la presencia de este metal.

La expresión de los genes APX y SOD es mayor en las plántulas expuestas a Ag@TiO_2 que en las expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Se investigó la expresión genética en plántulas expuestas durante un día a 1 mg/ml de Ag@TiO_2 , a 1 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, y en las del grupo control. Se obtuvo RNA de las plántulas y se realizaron varios RT-PCR, con oligos de diferentes genes (Tabla 4), que se analizaron en geles de agarosa (Fig. 28). Se investigó la respuesta antioxidante de *A. thaliana* mediante la expresión de los genes que codifican para las enzimas que se localizan en el citoplasma ascorbato peroxidasa (cAPX) (Fig. 5, Tabla 4), y la superóxido dismutasa que utiliza como cofactores cobre y zinc (CuZnSOD) (Fig. 6, Tabla 4); además se analizó la expresión del gen que codifica para una expansina, proteína que participa en el ablandamiento de la pared celular; y la expresión del gen que codifica para una proteína LEA (Late Embryogenesis Abundant) que aumenta su concentración en diversas situaciones de estrés. Se utilizó como control, el gen constitutivo actina (ACT). Los resultados son semicuantitativos y se visualizan en la Figura 28. Las plántulas expuestas a los MNEs mostraron una mayor expresión de los genes APX y SOD que la del control negativo (Fig. 28). La exposición de plantas a condiciones desfavorables incrementa la producción de EROs, y el proceso de detoxificación es esencial para la protección de las células y sus organelos. La ascorbato peroxidasa

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(APX) (E. C. 1.11.1.11) es una de las principales enzimas encargadas de la destoxificación del H_2O_2 (Fig. 5) (Caverzan *et al.*, 2012), mientras que la superóxido dismutasa SOD (E. C. 1.15.1.1) cataliza la conversión del radical superóxido ($\bullet O_2$) para convertirlo en H_2O_2 y O_2 (Fig. 6) (Alscher *et al.*, 2002) (Fig. 6). El incremento en la producción de estas enzimas por las plantas, es indicativo de que se está produciendo un estrés oxidativo que se debe contrarrestar. Los resultados de la expresión de APX y SOD, en plántulas de *A. thaliana* a $Ag@TiO_2$ y TiO_2-Cu^{2+} , muestran que la planta está respondiendo al estrés producido por los MNEs. Sin embargo, se observó una mayor expresión de ambos genes en las plántulas expuestas a $Ag@TiO_2$ que a TiO_2-Cu^{2+} , lo que manifiesta que en el material de plata produce un mayor estrés oxidativo, desencadenando con más intensidad la respuesta de la planta. Por otra parte, se estudió la expresión de genes de expansina (*EXP*), proteínas que participan en la elongación de la pared celular vegetal (Fig. 7) (Cosgrove, 1999) y de los genes *lea*, que codifican para proteínas involucradas en la protección de plantas superiores al estrés ambiental (Tunnacliffe & Wise, 2007). Sin embargo, en plántulas no se observó expresión en ninguna de las condiciones ni de *EXP* ni de *LEA* (Fig. 28).

Los MNEs son observados mediante microscopía electrónica de barrido en plántulas expuestas. En la Figura 29 se muestra una serie de fotografías tomadas con el microscopio electrónico de barrido, de plántulas de *A. thaliana*, expuestas a $Ag@TiO_2$ y TiO_2-Cu^{2+} y las del control negativo, para analizar posibles cambios en el tejido y observar los MNEs. Plántulas expuestas a los MNEs muestran una gran cantidad de partículas adheridas a la superficie, lo que no fue tan evidente en las del control negativo (Fig. 29). Varios estudios han revelado que los MNEs pueden adherirse a la superficie de las plantas, dependiendo de las características de los MNEs y de la presencia de tricomas en la planta que facilitan la asociación (Zhou *et al.*, 2011). La adhesión a la planta puede facilitar el ingreso de iones, como son Ag^+ y Cu^{2+} liberados de los MNEs, lo que coincide con nuestra observación de que se encontraron más altas concentraciones de plata en plantas expuestas a $Ag@TiO_2$ que las expuestas a plata coloidal. Las características de los MNEs pueden dificultar el ingreso de los materiales completos a capas profundas de la planta (Fig. 12). Los MNEs de $Ag@TiO_2$ y TiO_2-Cu^{2+} son esféricos con un diámetro aproximado de 10 nm, sin embargo, forman agregados de diferente tamaño dependiendo del medio en que se encuentren: en agua destilada $Ag@TiO_2$ forma agregados de 467 nm y TiO_2-Cu^{2+} de 360 nm, mientras que en buffer de fosfatos el tamaño medio de los agregados es

de 776 nm para Ag@TiO₂, y de 750 nm para TiO₂-Cu²⁺ (Garcidueñas-Piña *et al.*, 2016). Estas partículas son demasiado grandes para ingresar en la célula vegetal, cuya pared tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm, aunque podrían ingresar a los estomas, que tienen una capacidad de hasta 10 μm (Dietz & Herth, 2011). El ingreso de los MNEs a las plantas puede repercutir en algún aspecto del desarrollo de la planta, Ag@TiO₂, y TiO₂-Cu²⁺ por sus dimensiones, difícilmente ingresan, lo que limita su toxicidad, aunque muchos de los efectos que se observaron parecen estar relacionados con el ingreso de sus iones Ag⁺ y Cu²⁺. Por otra parte, estos MNEs podrían liberarse accidentalmente al medio ambiente, y entrar en contacto con diferentes plantas, incluso de interés agrícola. Las plantas podrían bioacumular los MNEs adhiriéndolos a su superficie, y entonces, transferirlos a su consumidor (Rico *et al.*, 2011). De esta manera, los animales pueden tener acceso a los MNEs no sólo directamente del ambiente, sino también a través de su alimento. Sería interesante investigar las implicaciones en la salud de los animales expuestos a los MNEs por las diferentes vías.

En cultivos de células vegetales en suspensión expuestos a los MNEs se observó una modificación en la actividad de catalasa y en la expresión de los genes de SOD, EXP y LEA. En un experimento diferente, considerando que la exposición directa sobre las células vegetales, puede provocar una respuesta más evidente y homogénea, cultivos de células vegetales en suspensión de una semana de incubación, se expusieron a diferentes concentraciones de los MNEs bajo irradiación y en la oscuridad, durante un día, para analizar la actividad de catalasa y la expresión de los genes APX, SOD, EXP y LEA. Los resultados de actividad de catalasa en los cultivos celulares se presentan en la Figura 30. Al no haber valores de referencia de actividad de catalasa para cultivos de células vegetales, la comparación es con el control negativo. Algunos cultivos celulares expuestos a los MNEs no mostraron diferencias significativas con respecto de control, mientras que otros grupos mostraron una actividad significativamente mayor (Fig. 30a). Comparando con lo observado en las plántulas expuestas a Ag@TiO₂, los cultivos celulares presentaron una respuesta significativa a menor concentración, lo que indica una mayor respuesta en las células en contacto con el MNEs. Sin embargo, al comparar los valores porcentuales, el incremento en actividad de catalasa observado en los cultivos celulares (30% con 10 mg/ml) supone un estrés oxidativo moderado (Fig. 30a), mientras que el observado en las plántulas (160% con 10 mg/ml) sugiere un mayor estrés oxidativo (Fig. 27). Por

otra parte, y para analizar los efectos de la plata, se midió la actividad de catalasa en cultivos expuestos a Ag^0 . Estos cultivos mostraron una actividad de catalasa 20.4% bajo irradiación y 30.8% en la oscuridad mayor que su grupo control (Fig. 30a). Lo que manifiesta nuevamente la participación de la plata en la generación de EROs y en la respuesta de la planta (Fig. 32). Por su parte, los cultivos de células de *A. thaliana* expuestos desde 0.5 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ y a CuSO_4 mostraron un incremento de la actividad de catalasa (Fig. 30b). La catalasa es una enzima que participa en la eliminación de H_2O_2 , principalmente cuando las concentraciones en las células son muy elevadas. Estos resultados evidencian que en los cultivos expuestos se está generando H_2O_2 en exceso, lo que provoca un incremento en la actividad enzimática, como se ha observado en otros estudios (Santos *et al.*, 2013). Sin embargo, el incremento de actividad no es muy drástico, en comparación a lo observado en las plantas, donde se encontraron diferencias de hasta 179% con respecto al control (con 10 mg/ml de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$), en las que se considera que las plantas están respondiendo a un estrés oxidativo severo.

Por otra parte, en un análisis diferente, se comparó la expresión de los genes *APX*, *SOD*, *EXP* y *LEA* en los cultivos expuestos a los MNEs y los del control negativo. Se utilizó como control el gen *ACT*. Los resultados son semicuantitativos y se visualizan en la Figura 31. En las tres condiciones evaluadas, se observó una expresión similar del gen de *APX* (Fig. 31), probablemente las propias condiciones del cultivo inducen la generación de H_2O_2 y la respuesta antioxidante de las células. Por su parte, la expresión del gen *SOD* también se observó en los tres tratamientos de los cultivos, sin embargo, es ligeramente mayor en los expuestos a Ag@TiO_2 . Esto hace suponer, que este material y los iones se disocian, inducen una mayor respuesta al estrés oxidativo mediante este mecanismo, que el material de cobre. Por otra parte, el gen de *EXP* mostró un incremento en su expresión en los cultivos expuestos a Ag@TiO_2 , con respecto a los del control negativo y los expuestas a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$. Las expansinas son proteínas que se encuentran en la pared celular vegetal, y participa en la modulación de su alargamiento y expansión, lo que permita el crecimiento celular y de las plantas y la maduración del fruto (Le Gall *et al.*, 2015). Son las únicas proteínas que producen una relajación de la estructura de la pared celular vegetal y permiten la incorporación de subunidades a los polímeros, dándose una extensión (Cosgrove, 1999). Diversas condiciones de estrés modifican el crecimiento de las plantas y/o el grosor de la pared celular, ya que su arquitectura es importante en la resistencia al estrés abiótico (Le Gall *et al.*, 2015). Como se mencionó antes, las plántulas expuestas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a bajas concentraciones de Ag@TiO_2 , incrementan la elongación del tallo y raíz, fenómeno en el que podrían estar involucradas las expansinas. Aunque no se observó incremento en la expresión del gen *EXP* en plantas expuestas a ese material, en los cultivos celulares sí. Lo que podría estar indicando, que Ag@TiO_2 induce este gen. Por otra parte, la expresión del gen *LEA* fue más evidente en los cultivos tratados con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ que en los expuestos a Ag@TiO_2 y al control negativo (Fig. 31). Las proteínas LEA, siglas de su nombre en inglés Late Embryogenesis Abundant (abundantes en la embriogénesis tardía), están involucradas en la protección de plantas superiores del daño causado por estrés ambiental. Entre las funciones de las proteínas LEA se incluyen su papel antioxidante y de estabilización de la membrana durante el estrés hídrico (Tunnacliffe & Wise, 2007). Un incremento en la producción de estas proteínas se da como respuesta a la exposición de los cultivos celulares a condiciones adversas. Los resultados sugieren que los cultivos expuestos a $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, fueron más capaces de inducir la expresión del gen *LEA* como mecanismo de defensa. Los resultados en cultivos de células proporcionan información de lo que ocurre sobre un grupo homogéneo de células vegetales, donde durante la exposición, todas tienen la misma probabilidad de entrar en contacto con los MNEs y de responder de manera similar (Lodish *et al.*, 2006). En la planta esto no ocurre, y sólo las células superficiales pueden estar en contacto con los MNEs, y su respuesta está regulada por otras células, lo que puede explicar las diferencias observadas.

8. CONCLUSIONES

Se demostró la actividad antimicrobiana de Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ contra *E. coli* y *S. cerevisiae*: ya que Ag@TiO_2 mostró tener mayor actividad contra *E. coli* que contra *S. cerevisiae*, ya que se logró una inactivación del 99.9% en menor tiempo. En cambio, $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ no presentó actividad contra *E. coli*; mientras que contra *S. cerevisiae* se consiguió una inactivación de hasta 99% después de 24 h de tratamiento con el mismo.

El tratamiento de semillas de *A. thaliana* con Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ para su desinfección y cultivo en condiciones axénicas es inadecuado, debido al crecimiento de hongos filamentosos. Estos MNEs mostraron una inhibición moderada en los hongos *Aspergillus* spp y *Fusarium* spp aislados, ya que tuvieron un crecimiento radial menor que los controles negativos.

La interacción de semillas de *A. thaliana* con Ag@TiO_2 y/o $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ no afectó la germinación ni el desarrollo posterior.

La interacción de las plántulas de *A. thaliana* con Ag@TiO_2 provocó cambios a diferentes niveles, dependiendo de la concentración, el tiempo y las condiciones de luz y oscuridad de exposición. Los cambios observados, fueron los siguientes:

- a) Las plántulas de la cepa silvestre expuestas a concentraciones bajas (1 mg/ml) de Ag@TiO_2 por un día, incrementaron su elongación en comparación con las plántulas del control negativo.
- b) Las plántulas de las cepas mutantes insensibles a etileno *etr1*, *ein2* y *ein3*, expuestas a concentraciones bajas (1 mg/ml) por un día, no mostraron un incremento significativo su elongación comparado con su respectivo control negativo, como se observó en la cepa silvestre.
- c) Las plántulas expuestas a concentraciones bajas de Ag@TiO_2 (1 mg/ml) por un día, en presencia de ACC (precursor del etileno), no incrementaron su elongación, como se observó en ausencia del ACC.

Se sugiere que el efecto estimulante observado en la cepa silvestre, es producido por el antagonismo de la plata proveniente del Ag@TiO_2 en los receptores del etileno.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- d) Las plántulas expuestas a altas concentraciones (10 mg/ml) de Ag@TiO₂, mostraron una disminución significativa en su elongación en comparación con las plántulas del control, ya que posiblemente a esas concentraciones el material produce fitotoxicidad.
 - e) Las plántulas expuestas a concentraciones bajas de Ag@TiO₂, incrementaron el contenido de clorofila total con respecto al control; mientras que a concentraciones elevadas, los niveles disminuyeron. Estos resultados demuestran que estos MNEs producen un efecto estimulante a bajas concentraciones e inhibitorio a altas, es decir, un efecto hormético.
 - f) Las plántulas expuestas a altas concentraciones de Ag@TiO₂, también incrementaron tanto el contenido de antocianinas como la actividad de catalasa en comparación con el control.
 - g) Las plántulas expuestas a Ag@TiO₂ indujeron una mayor expresión genética de SOD y APX, en comparación con las del control negativo. Esto indica que Ag@TiO₂ activa diferentes mecanismos de defensa ante estrés oxidativo en las plántulas de *A. thaliana* expuestas.

La interacción de las plántulas de *A. thaliana* con TiO₂-Cu²⁺ provocó cambios a diferentes niveles, dependiendo de la concentración, el tiempo y las condiciones de luz y oscuridad de exposición. Los cambios resultantes, fueron los siguientes:

- a) Las plántulas de la cepa silvestre expuestas a concentraciones desde 2.5 mg/ml, mostraron una menor elongación que su control negativo.
- b) Las plántulas de las cepas mutantes insensibles a etileno, *etr1*, *ein2* y *ein3*, expuestas a concentraciones de 2.5 mg/ml, mostraron también una menor elongación que su control negativo. Con lo que se comprueba que TiO₂-Cu²⁺ produce fitotoxicidad en las plántulas de *A. thaliana*, por mecanismos independientes de etileno.
- c) Las plántulas expuestas a concentraciones bajas de TiO₂-Cu²⁺, presentaron un incremento en el contenido de clorofila total con respecto al control; mientras que a concentraciones elevadas provocó una disminución. Esto demuestra que este material tiene un efecto estimulante a bajas concentraciones e inhibitorio a altas.
- d) Las plántulas expuestas a altas concentraciones incrementaron el contenido de antocianinas y mostraron una mayor actividad de catalasa en comparación con el control.

e) Las plántulas expuestas indujeron una mayor expresión genética de *APX*, en comparación con las del control negativo.

Estos resultados demuestran que las plántulas de *A. thaliana* activan diferentes mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo producido por la interacción con $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$.

Mediante los análisis de espectroscopía de absorción atómica, se demostró una mayor concentración de plata y cobre con respecto al control negativo, en las plántulas de *A. thaliana* expuestas a Ag@TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$, respectivamente. Los metales se disocian de los MNEs en los medios de exposición facilitando que la planta los absorba. Varios de los efectos observados son consecuencia de la actividad de los iones Ag^+ y Cu^{2+} , dentro de la planta.

Los MNEs se adhieren a la superficie de plantas de *A. thaliana* expuestas, es lo que sugiere la presencia de acúmulos observados mediante microscopía electrónica de barrido. Esto podría facilitar el ingreso de iones a la planta.

La interacción de Ag@TiO_2 con cultivos de células vegetales en suspensión de *A. thaliana* provocó estrés oxidativo, pues:

- a) Aumentó ligeramente la actividad de catalasa en los cultivos expuestos a altas concentraciones con respecto a los del control negativo.
- b) Indujo un incremento en la expresión de un gen de *SOD* en comparación con el control.

La interacción de Ag@TiO_2 con cultivos de células vegetales en suspensión de *A. thaliana* indujo un aumento en la expresión de un gen de *EXP* cuya proteína que está involucrada en la expansión de la pared celular.

La interacción de $\text{TiO}_2\text{-Cu}^{2+}$ con células vegetales en suspensión de *A. thaliana* provocó estrés celular, debido a que:

- a) Incrementó ligeramente la actividad de catalasa en los cultivos expuestos a altas concentraciones en comparación con el control negativo.
- b) Indujo una mayor expresión del gen *LEA* en cultivos de expuestos, que en los del control negativo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adelnour-Esquivel, A., & Escalant, J. V. 1994. Conceptos Básicos de Cultivos de Tejidos Vegetales. Ed. CATIE. México.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Akhavan, O. 2009. Lasting antibacterial activities of Ag-TiO₂/Ag/a-TiO₂ nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336:117-124.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany.* 53 (372): 1331-1342.
- Ammendolia, M. G., Losi, F., De Berardis, B., Guccione, G., Superti, F., Conte, M. P., Longhi, C. 2014. *Listeria monocytogenes* behavior in presence of non-UV irradiated titanium dioxide nanoparticles. *PloS ONE*, 9(1): e84986. Doi:101371/journal.pone.0084986.
- Anjum, N. A., Gill, S. S., A. C. Duarte, A. C., E. Pereira, E., I. Ahmad. 2013. Silver nanoparticles in soil plant systems. *Journal of Nanoparticle Research.* 15: 1896.
- Appleyard, R. K. 1954. Segregation of new lysogenic types during growth on a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* k12. *Genetics.* 39 (4): 440-452.
- Aslani, F., Bagheri, S., Julkapli, N. M., Juraimi, A. S., Hashemi, F. G., Baghdadi, A. 2014. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. *The Scientific World Journal.* Doi.org/101155/2014/6417592014.
- Bakshi, A., Wilson, R. L., Lacey, R. F., Kim, H., Wuppalapati, S. K., Binder, B. M. 2015. Identification of Regions in the Receiver Domain of the ETHYLENE

RESPONSE1 Ethylene Receptor of *Arabidopsis* Important for Functional Divergence. *Plant Physiology*.169: 219–232.

- Barnejee, A. N. 2011. The design, fabrication, and photocatalytic utility of nanostructured semiconductors: focus on TiO₂-based nanostructures. *Nanotechnology, science and applications*. 4: 35-65.

- Berg, H. C. 2003. *E. coli* in motion. Springer. Biological and Medical Physics biomedical engineering. Estados Unidos.

- Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C., Kende, H. 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 241: 1086–1089.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

- Casali, N. & Preston, A. 2003. *E. coli* plasmid vectors: methods and applications. The Human Press Inc. Estados Unidos.

- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. 2012. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1011–1019. 10.1590/S1415-47572012000600016

- Cyret, M. S. & Philpott, C. C. 2013. Regulation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 193 (3): 677-713.

- Cong, Y., Zhang, J., Chen, F., Anpo, M. & He, D. 2007. Preparation, Photocatalytic Activity, and Mechanism of Nano-TiO₂ Co-Doped with Nitrogen and Iron (III). *J. Phys. Chem.* 111: 10618-10623.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Cosgrove, D. J. (1999). Enzymes and the other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:391-417.

- Dietz K. J. & Herth S. 2011. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Science.* 16 (11): 582-589.

- Dorobantu, L. S., Fallone, C., Noble, A. J., Veinot, J., Ma, G., Goss, G., Burrell, R. E. 2015. Toxicity of silver against bacteria, yeast and algae. *Journal of Nanoparticle Research.* 17: 172.

- Eckhardt, S., Brunetto, P. S., Gagnon, J., Pirebe, M., Giese, B., Fromm, K. M. 2013. Nanobio Silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical Reviews.* 113: 4708.4754.

- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorran, F., Xie, Y. 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Scientific World Journal.* 2015: 756120.

- Feyissa, D. N., Løvdal, T., Olsen, K. M., Slimestad, R., Lillo, C. 2009. The endogenous GL3, but not EGL3, gene is necessary for anthocyanin accumulation as induced by nitrogen depletion in *Arabidopsis* rosette stage leaves. *Planta.* 230: 747-754.

- Foltete, A. S., Masfaraud, J. F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C., Labille, J., Rose, J., Féraud, J. F. 2011. Environmental impact of sunscreen materials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution*, 159: 2515-2522.

- Garcidueñas-Piña, C., Medina-Ramírez, I. E., Guzmán, P., Rico-Martínez, R., Morales-Domínguez, J. F., Rubio-Franchini, I. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of nano-structured materials of titanium dioxide doped with silver and/or copper and their effects in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Photoenergy.* Volume 2016, Article ID 8060847, 14 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8060847>

- Gholamabbas, S., Morteza, R., A. Aliasghar. 2013. Effect of silver nanoparticles on concentration of silver heavy element and growth indexes in cucumber (*Cucumis sativus* L. negeen)", *Journal of Nanoparticle Research.* 15: 1630.

- Giannousi, K., Sarafidis, G., Mourdikoudis, S., Pantazaki, A., Dendrinou-Samara, C. 2014. Selective Synthesis of Cu₂O and Cu/Cu₂O NPs: Antifungal Activity to Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and DNA Interaction. *Inorganic Chemistry*. 53: 9657-9666.

- Gogos, A., Knauer, K., Bucheli, T. D. 2012. Nanomaterials in plant protection and fertilization: Current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (39): 9781-9792.

- Grass, G., Rnsing, C., Soloiz, M. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (5): 1541-1547.

- Gupta, K., Shingh, R. P., Pandey, A., Pandey A. 2013. Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. Aeruginosa* and *E. coli*. *Beilstein J. Nanotechnol.* 4: 345-351.

- Guzman, P. & Ecker, J. R. 1990. Exploting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene related mutants. *The Plant Cell*. 2: 513-523.

- Hadduck, A. N., Hindagolla, V., Contreras, A. E., Li, Q., Bakalinsky, A. T. 2010. Does Aqueous Fullerene Inhibit the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* or *Escherichia coli*? *Applied and environmental microbiology*. 76 (24): 8239–8242.

- Hajjipour, M. J., Fromm, K. M, Ashkarran, A. A., Jiménez de Aberasturi, D., Ruiz de Larramendi, I., Rojo, T., Serpooshan, V., Park, W. J., Mahmoudi, M. 2012 Antibacterial property of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 30 (10): 499-510.

- Hamal, D. R., Haggstrom, J. A., Marchi, G. L., Ikenberry, M. A., Hohn, K., Klabunde, K. J. 2009. A multifunctional biocide/sporicide and photocatalyst based on titanium dioxide (TiO₂) codoped with silver, carbon and sulfur. *Langmuir*. 26(4): 2805- 2810.

- Hopwood, D. A. & Chater, K. E. 1989. Genetics of bacterial Diversity. Academic Press, Oxford.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Ivanova, E. M., Kholodova, V. P., Kuznetsov, V. I. P. 2010. Biological effects of high copper and zinc concentrations and their interaction in rapeseed plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 57 (6): 806-814.

- Jaramillo-Juárez, F., Rincón-Sánchez, A. R., Rico-Martínez, R. 2009. Toxicología ambiental. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.

- Josko, I. & Oleszczuk, P. 2014. Phytotoxicity of nanoparticles—problems with bioassay choosing and sample preparation. *Environmental Scientific Pollute Research*, 21:10215–10224.

- Kahru, A. & Dobourguier, H. C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*. 269: 105-119.

- Keunen, E., Schellingen, K., Vangronsveld J., Cuypers, A. 2016. Ethylene and Metal Stress: Small Molecule, Big Impact. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00023. eCollection 2016.

- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., Ecker, J. R. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*. 72 (3):427–41. doi: 10.1016/0092-8674(93)90119-B.

- Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, Y. S., Min, J. S., Lee, Y. S. 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Microbiology*. 40 (1): 53-58.

- Kim, J. H., Lee, Y., Kim, E. J., Gu, S., Sohn, E. J., Seo, Y. S. , An, H. J., Chang, Y. S. 2014. Exposure of iron nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* enhances root elongation by triggering cell wall loosening. *Environmental Science & Technology*. 48: 3477-3485.

- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. A., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J. y Lead, J. R. 2008. Nanomaterials in the environment; behavior, fate, bioavailability and effects. Critical Review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27 (9): 1825-1851.

- Kole C., Kole, P., Randunu, K. M., Choudhary, P., Podila, R., Ke, P. Ch., Rao, A. M., Marcus, R. 2013. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charanddica*). *BMC Biotechnology*. 13:37.

- Kongsong, P., Sikong, L., Niyomwas, S., Rachpech, V. 2014. Photocatalytic antibacterial performance of glass fiber thin film coated with N-doped SnO₂/TiO₂. *The Scientific World Journal*, ID 869706, 9 pages.

- Kovinich, N., Kayanja, G., Chanoca, A., Otegui, M. S., Grotewold, E. 2015. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 10 (7):e1027850. doi: 10.1080/15592324.2015.1027850.

- Kramer, V. & Clemens, S. 2005. Topics in current genetics. Ed. Molecular Biology of metal homeostasis and detoxification. 14: 225-228.

- Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V., Yadav, S. K. 2013. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Science of the Total Environmental*. 461-462: 462-468.

- Landa, P., Vankova, R., Andrlova, J., Hodek, J., Marsik, P., Storchova, H., White, J. C., Vanek, T. 2013. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of Hazardous Materials*. 241-242: 55-62.

- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard, B., Flank, A. M., Brisset, F., Carriere, M. 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Science of Total Environment*, 431: 197-208.

- Lawrence, J. C. & Ochman, H. 1998. Molecular archeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9413-9417.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Lee, C., Kim, J. Y., Lee, W. I., Nelson, K. L., Yoon, J., Sedlak, D. L. 2008. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* 42(13): 4927-4933.

- Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y. C., Braam, J., Alvarez, P. J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 29 (3): 669-675.

- Lee, S., Kim, S., Kim, S., Lee, I. 2013. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environmental Science Pollut Reserch.* 20:848–854.

- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J-M, Gillet, F., Pelloux, J., Rayon, C. 2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants (Basel).* 4(1): 112–166. doi: 10.3390/plants4010112

- Lewin, B. 1998. *Gene V.* Oxford Cell press, Oxford.

- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., Alvarez, P. J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Research.* 42(18): 4591-4602.

- Li, J., Chang, P. R., Huang, J., Wang, Y., Yuan, H., Ren, H. 2013. Physiological effects of magnetic iron oxide nanoparticles towards watermelon. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 13 (8): 5561-5567.

- Liga, M. V., Bryant, E. L., Colvin, V. L., Li, Q. 2011. Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment. *Water Research.* 45: 535-544.

- Liga, M. V., Maguire-Boyle, S. J., Jafry, H. R., Barron, A. R., Li, Q. 2013. Silica decorated TiO₂ for virus inactivation in drinking water-simple synthesis method and mechanisms of enhanced inactivation kinetics. *Environmental Science Technology.* 47 (12): 6463-6470.

- Lin, X., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yang, K., Tong, M., Lin, D. 2014. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of particle size, crystal phase and water chemistry. *PLoS ONE*, 9(10): e110247. doi: 10.1371/journal.pone.0110247.

- Lin, D. H. & Xing, B. S. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 150: 243-250.

- Lincoln, T. & Zeiger, E. 2010. Plant Physiology, 5th edition, Sinauer Associates, USA.

- Liou, J. W. & Chang, H. H. 2012. Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 60(4): 267-75.

- Liu, W., Su, P., Gonzales III, A., Chen, S., Wang, N., Wang, J., Li, H., Zhang, Z., Webster, T. J. 2015. Optimizing stem cell functions and antibacterial properties of TiO₂ nanotubes incorporated with ZnO nanoparticles: experiments and modeling. *International Journal of Nanomedicine*. 10:1997-2019.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., Darnell, J. 2006. Biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana. 5ª edición.

- López-Gómez, R & Gómez-Lim, M. A. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience* 27(5):440–442.

- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*. 408 (16): 3053-3061.

- Maurer-Jones, M. A., Gunsolus, L. I., Murphy, C. J., Hynes, C. L. 2013. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal Chemistry*. 85(6):3036-3049.

McEvoy, J. G. & Zhang, Z. 2014. Antimicrobial and photocatalytic disinfection mechanisms in silver-modified photocatalysts under dark and light conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochem. Reviews.* 19: 62-75.

- Medina-Ramírez, I., Luo, Z., Bashir, S., Mernaugh, R., Liu, J. L. 2011. Facile design and nanostructural evaluation of silver-modified titania used as disinfectant. *Dalton Transactions.* 40 (5): 1047-1054.

- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, S., Noctor, N. 2010. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany.* 61 (15): 4197–4220. doi:10.1093/jxb/erq282

- Miralles P., Church T. L., Harris, A. T. 2012 a. Toxicity, Uptake, and Translocation of Engineered Nanomaterials in Vascular Plants. *Environmental Science and Technology.* 46: 9224-9239.

- Miralles, P., Johnson, E., Church, T. L., Harris, A. T. 2012 b. Multiwalled carbon nanotubes in alfalfa and wheat: toxicology and uptake. *Journal of Royal Society Interface,* 9: 3514-3524.

- Mirzajan, L., Askari, H., Hamzebu, S., Farzaneh, M., Ghassempour, A. 2013. Effect of silver nanoparticles on *Oriza sativa* L and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 88:48-54.

- Moscatiello, R., Baldan, B., Navazio, L. 2013. Plant cell suspension cells. *Methods Mol. Biol.* 953: 77-93.

- Morteza, E., Moaveni, P., Farahani, H. A., Kiyani, M. 2013. Study of photosynthetic pigments changes of maize (*Zea mays* L) under nano TiO₂ spraying at various growth stages. *Springerplu.* 2 (1): 217.

- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum.* 15: 473-497.

- Nair, P. M. G., Chung, I. M. 2014 a. Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science Pollut Research*. 21: 8858- 8869.

- Nair, P. M. & Chung, I. M. 2014 b. Physiological and molecular level of silver nanoparticles exposure in rice (*Oriza sativa*) seedling. *Chromosphere*, 112: 105-113.

- Nair, P. M. & Chung, I. 2014 c. M. Study of the correlation between copper oxide nanoparticles induce growth suppression and enhance lignification in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 113: 302-313.

- Negroni, M. 2009. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Editorial Médica Panamericana. 2ª edición. Argentina.

- Pan, X., Medina-Ramírez, I., Mernaugh, R, Liu, J. 2010. Nanocharacterization and bactericidal performance of silver modified titania photocatalyst. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. 77:82-89.

- Peñarrubias, L. Romero, P., Carrió-Seguí, A., Andrés-Bordería, A., Moreno, J., Sanz, A. 2015. Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Frontiers in Plant Science*. Doi 103689/fpls.2015.00255.

- Pokherel, L. R. & Dubey, B. 2013. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 452-453: 321-332.

- Pool, C. P. & Owens, F. J. 2003. Introducción a la Nanotecnología. Ed. Reverté. España.

- Pramakin, A., Laha, D., Bhattacharya, D., Pramakin, P. 2012. A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 96:50-55.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Queiroz, A. M., Mezacasa, A. V., Graciano, D. E., Falco, W. F., M'Peko, J. C., Guimarães, F. E., Lawson, T., Colbeck, I., Oliveira, S. L., Caires, A. R. 2016. Quenching of chlorophyll fluorescence induced by silver nanoparticles. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 168:73-7. doi: 10.1016/j.saa.2016.05.033.

- Rana, S. & Kalaichelvan, P. T. 2013. Ecotoxicity of Nanoparticles. *ISRN Toxicity*. ID 574648. Doi.org//10.1155/2013/574648.

- Redes-García, R & Collazo-Ortega, M. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. Las Prensas de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.* 59(8): 3485–3498. doi:10.1021/jf104517j

- Rothstein R. J. 1977. A genetic fine structure analysis of the suppressor 3 locus in *Saccharomyces*. *Genetics* 85, 55–64.

- Sadava, D. 2009. Vida, la Ciencia de la Biología. 8ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.

- Sahu, M. & Biswas, P. 2011. Single-step processing of copper-doped titania nanomaterials in a flame aerosol reactor. *Nanoscale Research Letters*. 6:441

- Salisbury, F. B. & Ross, C. V. 1994. Fisiología vegetal, Grupo editorial Iberoamericano, México, 1994.

- Santaella, C., Allainmat, B., Simonet, F., Chanéac, C., Labille, J., Auffan, M., Rose J., Achouak, W. 2014. Aged TiO₂-based nanocomposite used in sunscreens produces singlet oxygen under long-wave UV and sensitizes *Escherichia coli* to cadmium. *Environmental Science Technology*. 48(9): 5245-5253.

- Santhoshkumar, T., Rahuman, A. A., Jayaseelan, C., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Kirthi, A. V., Velayutham, K., Thomas, J., Venkatesan, J., Kim, S. K. 2014. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its

antibacterial and antioxidants properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 968-976.

- Santos, C. L. V., Pourrut, B., Ferreira de Oliveira, J. M. P. 2013. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontier in Genetics*. Doi 103389/fgene.2015.00216.

- Seil, J. T. & Webster, T. J. 2012. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*. 7:2767-2781.

- Sethy, S. K. & Ghosh, S. 2013. Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 4 (2): 272-275.

- Sharma, S. K. 2015. Heavy metals in water: presence, removal and safety. Ed. Royal Society of Chemistry. Reino Unido.

- Shaw, A. K. & Hossain, Z. 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*. 93: 906-915.

- Shen, C. X., Zhang, Q. F., Li, J., Bi, F. Ch., Yao, N. 2010. Induction of programmed cell death in Arabidopsis and rice by single-wall carbon nanotubes. *American Journal of Botany* 97(10): 1602–1609.

- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology*. 10:15 1-33.

- Siddiqui, M. H. & Al-Wahibi, M. H. 2014. Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Saudi Journal of Biological Science*. 21: 13-17.

- Simon, D. F., Domingos, R. F., Hauser, C., Hutchins, C. M., Zerges, W., Wilkinson, K. J. 2013. Transcriptome Sequencing (RNA-seq) Analysis of the Effects of Metal Nanoparticle Exposure on the Transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(16): 4774–4785.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., Lee, E. J. 2013. Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicol Environmental Safety*. 93:60-67.

- Syu, Y. Y., Hung, J. H., Chen, J. C., Chuang, H. W. 2014. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*. 83:57-64.

- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408, 796-815.

- Thomas, J. T: S. & Webster, J. 2012. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*. 7 2767–2781.

- Tunnacliffe, A. & Wise, M. J. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*. 94 (10): 791-812.

- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., Bracale, M. 2013. Morphological and Proteomic Response of *Eruca sativa* Exposed to silver Nanoparticles or silver nitrate. *Plos One*, 8 (7): e68752 doi: 10.1371/journal.pone.0068752.

- Velazquez. L. 2008. *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª edición. España: Editorial Médica Panamericana. Pag. 883-892.

- Wang, J., Koo, Y., Alexander. A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J. L., Colvin, L., Braam, J., Alvarez, P. J. 2013. Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environmental Science and Technology*. 47 (10): 5442-5449.

- Wilker, M. B., Schitzenbaumer, K. J., and Dukovic, G. 2012. Recent Progress in photocatalysis mediated by colloidal II-VI nanocrystals. *Israel Journal Chemistry*. 52, 1002-1015.

- Wilson, Z. A. 2000. Arabidopsis. Laboratory manuals. Practical Approach Series. Oxford University Press. Estados Unidos.

- Wu, B., Huang, R., Sahu, M., Feng, X., Biswas, P., Tang, Y. J. 2010. Bacterial response to Cu-doped TiO₂ nanoparticles. *Science of the total environment*, 408: 1755-1758.

- Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L., Alvarez, P. J. 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*. 12 (8): 4271-4275.

- Yang, X. H., Fu, H. T., Wang, X. C., Yang, J. L., Jiang, X. C., Yu, A. B. 2014. Synthesis of silver-titanium dioxide nanocomposites for antimicrobial applications. *Journal of Nanoparticle Research*. 16: 2526.

- Yin, L., Colman, B. P., McGill, B. M., Wright, J. P., Bernhardt, E. S. 2012. Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of eleven wetland plants. *Open Acces*, 7: 1-7.

- Zhang, D., Hua, T., Xiao, F., Chen, C., Gersberg, R. M., Liu, Y., Stuckey, D., Ng, w. J., Tan, S, K. 2015. Phytotoxicity and bioaccumulation of ZnO nanoparticles in *Schoenoplectus tabernaemontani*. *Chemosphere*. 120: 211-219.

- Zhao, L., Peng, B., Hernández-Viezcas, J. A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J. R., Tanq, X., Niu, G., Jin, L., Varela-Ramírez, A. Zhang, J. Y., Gardea-Torresdey, J. L. 2012. Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO₂ nanoparticles: cross talk among H₂O₂, heat shock protein, and lipid peroxidation. *ACS Nano*. 6 (11): 9615-9622.

- Zhou, D. M., Jin, S. Y., Li, L. Z., Wang, Y., Weng, N. Y. 2011. Quantifying the adsorption and uptake of CuO nanoparticles by wheat root based on chemical extractions. *Journal of Environmental Sciences*. 23(11): 1852–1857.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

APÉNDICE

MEDIOS DE CULTIVO

LB (Luria-Bertani)

Extracto de levadura 0.5 %

Peptona de caseína 1 %

NaCl 0.5 %

Agar bacteriológico 1.2 %

PD (Papa-Dextrosa)

Base de Difco ® 2.4 %

Agar bacteriológico 1.2 %

MS (Murashige-Skoog)

Sacarosa 30 g/L

Nitrato de potasio 1.9 g/L

Nitrato de amonio 1.65 g/L

Solución A: 44 % cloruro de calcio 1 ml/L

Solución B: 0.083 % yoduro de potasio, 0.0025 % cloruro de cobalto 1 ml/L

Solución C: 6.8 % fosfato monobásico de potasio, 0.248 % ácido bórico 2.5 ml/L

Solución D: 14.8 % sulfato de magnesio, 0.68 % sulfato de manganeso, 0.344 % de sulfato de zinc, 0.001 % sulfato de cobre 2.5 ml/L

Solución E: 0.557 % sulfato ferroso heptahidratado, 0.745 % EDTA. 5 ml/L

Solución F: 0.02 % glicina, 0.005 % piridoxina, 0.005 % ácido nicotínico, 0.001 % tiamina, 1% mio-inositol 10 ml/L

Ajustar a pH 5.7

Agar para plantas 8 g/L

SOLUCIONES

Buffer de fosfatos 0.05 M pH 7

Fosfato monobásico de potasio 6.8g/L

Fosfato dibásico de potasio 13.9 g/L

Buffer de extracción de proteínas

100 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA pH 8

0.2 % tritón

Reactivo de Bradford

0.01 % Azul de Coomasie G-250

5 % Etanol

10 % ácido fosfórico

Estándar de albúmina sérica de bovino

1 mg/ml de albúmina sérica de bovino

Buffer de reacción de catalasa

Buffer de fosfatos 0.05 M pH7

H₂O₂ 0.1 mM

Buffer de lisis para RNA

Tris-borato pH 7.5 150 mM

EDTA 50 mM

SDS 2%

Beta mercapto etanol 1 %

Acetato de potasio 5 M

Acetato de potasio 49.07 g/ 100 ml

Fenol-cloroformo (1:1)

Fenol equilibrado pH 8 50 ml

Cloroformo 50 ml

Cloroformo-alcohol isoamílico (49:1)

Cloroformo 49 ml

Alcohol isoamílico 1 ml

Cloruro de litio 6 M

Cloruro de litio 25.4 g/100 ml

TAE 10X pH 8

Tris base 48.4 g/L

Ácido acético glacial 11.42 g/L

EDTA 7.44 g/L

EDTA 0.5 M pH 8

Ácido etiléndiamino tetraacético 14.6 g / 100 ml. Ajustar pH con NaOH sólido. Aforar.

