



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TORREÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**IMPACTO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LA
EXPRESIÓN GÉNICA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LECHUGA,
USANDO RÁBANO COMO CONTROL DE GERMINACIÓN**

Tesis que presenta:

MC. ALMA PATRICIA GALINDO GUZMÁN

Como requisito parcial para obtener el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS EN AGUA Y SUELO

Director de tesis:

Dr. Manuel Fortis Hernández

Co-director de tesis:

Dra. Magdalena Galindo Guzmán



Torreón, Coahuila, México

Septiembre, 2025

**Hoja de Autorización o cesión de derechos de la
propiedad de la tesis al Tecnológico Nacional de
México – Instituto Tecnológico de Torreón**

La presente tesis titulada: “**Impacto de nanopartículas de óxido de zinc en la expresión génica y actividad enzimática de lechuga usando rábano como control de germinación**” realizada por la alumna Alma Patricia Galindo Guzmán bajo la dirección del comité particular indicado, ha sido aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN AGUA Y SUELO

COMISIÓN REVISORA

Director: _____

Dr. Manuel Fortis Hernández

Co-director: _____

Dra. Magdalena Galindo Guzmán

Asesor: _____

Dra. Erika Lagunes Fortiz

Asesor: _____

Dr. Pablo Preciado Rangel

Asesor: _____

Dra. Sellenne Yuridia Márquez Guerrero

Torreón, Coahuila, México 2025

RESUMEN

La creciente demanda de alimentos, la disminución de tierras cultivables y el crecimiento de la población mundial, plantea desafíos urgentes para la seguridad alimentaria global. En este contexto, se requiere el desarrollo de prácticas agrícolas innovadoras, sostenibles y eficientes que permitan incrementar el rendimiento y valor nutricional de los cultivos. Una estrategia prometedora en este ámbito es la biofortificación mediante el uso de nanotecnología, específicamente a través de nanopartículas metálicas como las de óxido de zinc (ZnO), que han demostrado mejorar el crecimiento vegetal, la síntesis de metabolitos bioactivos y la tolerancia al estrés.

El presente estudio evalúa el efecto de la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) en diferentes concentraciones sobre *Lactuca sativa* L. y *Raphanus sativus* L. El trabajo se estructura en cuatro capítulos. En el Capítulo 1, se realiza una revisión exhaustiva de la literatura científica sobre el uso de nanopartículas en la agricultura, sus interacciones con las plantas, y los mecanismos fisiológicos implicados. En el Capítulo 2, se describe la síntesis y caracterización fisicoquímica de las NPs-ZnO y se evalúa su efecto inicial sobre la germinación de semillas de lechuga. El Capítulo 3 presenta la aplicación de estas nanopartículas en germinados de rábano (*Raphanus sativus* L.), utilizado como modelo biológico para validar los efectos observados. Finalmente, el Capítulo 4 aborda la evaluación integral de las NPs-ZnO en plantas de lechuga en etapa productiva, mediante análisis de parámetros morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, y moleculares.

Los resultados obtenidos muestran que concentraciones adecuadas de NPs-ZnO favorecen significativamente la biomasa fresca y seca, el contenido de clorofila, carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides y vitamina C. Asimismo, se registró un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes (CAT, SOD y POD), así como en la expresión génica de estas enzimas en lechuga, indicando un fortalecimiento del sistema de defensa antioxidante frente al estrés oxidativo. Además, se observó una mayor acumulación de zinc en los tejidos foliares, validando su potencial como agente biofortificante.

En conjunto, esta investigación contribuye al conocimiento actual sobre la aplicación de nanomateriales y su efecto en la calidad nutracéutica y fisiológica de los cultivos.

Palabras clave: Nanotecnología, biofortificación, capacidad antioxidante, calidad nutracéutica.

ABSTRACT

The increasing demand for food, the reduction of arable land, and the growth of the global population pose urgent challenges to global food security. In this context, the development of innovative, sustainable, and efficient agricultural practices is required to enhance crop yield and nutritional value. A promising strategy in this field is biofortification through the use of nanotechnology, specifically via metallic nanoparticles such as zinc oxide (ZnO), which have been shown to improve plant growth, the synthesis of bioactive metabolites, and stress tolerance.

This study evaluates the effect of foliar application of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) at different concentrations on *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. The work is structured into four chapters. Chapter 1 presents a comprehensive review of the scientific literature on the use of nanoparticles in agriculture, their interactions with plants, and the physiological mechanisms involved. Chapter 2 describes the synthesis and physicochemical characterization of ZnO-NPs and evaluates their initial effects on lettuce seed germination. Chapter 3 explores the application of these nanoparticles to radish sprouts (*Raphanus sativus* L.), used as a biological model to validate the observed effects. Finally, Chapter 4 provides an integrated assessment of ZnO-NPs on lettuce plants at the productive stage, through the analysis of morphological, physiological, biochemical, and molecular parameters.

The results show that appropriate concentrations of ZnO-NPs significantly enhance fresh and dry biomass, chlorophyll content, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids, and vitamin C. In addition, an increase in the activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD, and POD), as well as in the gene expression of these enzymes, was observed, indicating a strengthening of the antioxidant defense system against oxidative stress. A higher accumulation of zinc in foliar tissues was also recorded, confirming its potential as a biofortifying agent.

Overall, this research contributes to current knowledge on the application of nanomaterials and their effect on the nutraceutical and physiological quality of crops.

Keywords: Nanotechnology, biofortification, nutraceutical quality.

DEDICATORIA

IN MEMORIAM

A mi padre, Antonio Galindo García, por ser mi eterno héroe. Tu espíritu y amor me acompañaron en cada desafío. Te extraño y te honro en cada logro.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)**, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo los estudios de posgrado.

Al **Instituto Tecnológico de Torreón (ITT)**, por brindarme un espacio de crecimiento personal y profesional. Agradezco especialmente a sus docentes, investigadores, personal administrativo, quienes con su disposición y calidad humana hicieron posible que este proceso se llevara a cabo de manera integral.

Al **Dr. Manuel Fortis Hernández**, mi director de tesis. Por su orientación, paciencia y por confiar en mis capacidades desde el inicio, su compromiso con la excelencia ha sido una fuente constante de aprendizaje e inspiración.

Al comité de asesores por sus valiosas observaciones, **Dra. Magdalena Galindo Guzmán, Dra. Erika Lagunes Fortiz, Dr. Pablo Preciado Rangel y la Dra. Sellenne Yuridia Márquez Guerrero**, que enriquecieron significativamente el desarrollo de esta investigación.

A mi familia, en especial a mi madre **Magdalena Guzmán Rodríguez**, por su amor incondicional, sus sacrificios y por enseñarme desde pequeña el valor del esfuerzo y la perseverancia. Sin su ejemplo, este logro no habría sido posible.

A mi **hermana**, quien además de ser mi co-directora de tesis, fue un pilar fundamental en este proceso. Su guía académica, y el acceso a las instalaciones de la **Universidad Politécnica de la Región Laguna** hicieron posible que este trabajo avanzara en momentos clave. A mis queridas **sobrinas**, gracias por su cariño. A mi **tía**, por su apoyo constante, sus palabras de aliento y su fe inquebrantable en mí. Cada una de ustedes ha sido una parte invaluable de este logro.

A mis compañeros del posgrado, y del equipo de trabajo, **Alexis, Eunice, Yenifer, Yazmin, Alejandro, David, Zulema, Janet, Jesica, Mayte, Edgar** gracias por las charlas, el apoyo mutuo y la amistad que hicieron más llevadero este camino. Compartir este viaje con ustedes fue una experiencia invaluable. También quiero compartir este logro con mi amiga **Diana Amaret**, que, aun a la distancia, me acompaña con su apoyo y amistad haciendo más especial este recorrido. A mi amiga **María José**, por estar presente en cada etapa de mi vida.

A mi **esposo**, gracias por su paciencia, comprensión y compañía constante, incluso en los momentos más difíciles. Su apoyo emocional ha sido mi refugio y mi fuerza.

Y finalmente, agradezco a la vida por las oportunidades, los retos y los aprendizajes que me han traído hasta aquí.

Gracias

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA	5
1.1 Zinc.....	6
1.1.1 Importancia del zinc en la salud humana	6
1.1.2 El rol de zinc en la nutrición vegetal	7
1.1.3 Absorción de zinc en la planta	8
1.1.4 Importancia y disponibilidad de zinc en el suelo	9
1.1.5 Factores que causan deficiencia de zinc en las plantas	11
1.1.6 Síntomas de deficiencia de zinc en plantas	13
1.1.7 Respuestas de las plantas a la deficiencia de zinc	14
1.2 Biofortificación	15
1.2.1 La biofortificación como estrategia para abordar las deficiencias globales de micronutrientes.....	15
1.2.2 Procesos utilizados para lograr la biofortificación	16
1.2.3 Compuestos bioactivos en cultivos biofortificados	18
1.3 Nanotecnología: Nanopartículas como nuevos elicitores para la producción de compuestos bioactivos	19
1.3.1 Nanotecnología.....	19
1.3.2 Clasificación de nanomateriales	20
1.3.3 Métodos de síntesis de nanopartículas.....	20
1.4 Efectos de las nanopartículas aplicadas en cultivos agrícolas	22
1.4.1 Nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO).....	26
1.4.2 Impacto de las nanopartículas en el sistema antioxidante de las plantas.....	28

1.4.2.1	Moléculas enzimáticas	30
1.4.2.2	Expresión génica	31
1.5	El cultivo de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	33
1.5.1	Valor nutricional del cultivo de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	35
1.5.2	Producción del cultivo de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.) en sistemas hidropónicos	36
1.6	Literatura citada	38
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y SU EVALUACIÓN EN PLÁNTULAS DE <i>Lactuca sativa</i>		54
2.1	Resumen	55
2.2	Abstract	56
2.3	Introducción	57
2.4	Materiales y métodos	58
2.4.1	Localización del experimento	58
2.4.2	Síntesis de nanopartículas de ZnO	58
2.4.3	Caracterización de nanopartículas de ZnO	58
2.4.4	Prueba de germinación de semillas.....	59
2.4.5	Medición de índices fisiológicos	59
2.4.6	Determinación del contenido de clorofila (Chl) y carotenoides	60
2.4.7	Contenido total de fenoles.....	60
2.4.8	Análisis estadístico	61
2.5	Resultados y discusión.....	62
2.5.1	Síntesis de nanopartículas de ZnO	62
2.5.2	Caracterización de nanopartículas de ZnO	62
2.5.3	Efecto de las NPs-ZnO en la germinación de semillas Índices fisiológicos ..	62
2.5.4	Clorofila y carotenoides	65
2.5.5	Fenoles.....	66
2.6	Conclusiones.....	67
2.7	Literatura citada.....	68

CAPÍTULO 3. NANOPARTÍCULAS DE ZnO, SINTETIZADAS POR PRECIPITACIÓN QUÍMICA, PARA INCREMENTAR LA GERMINACIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN GERMINADOS DE *Raphanus sativus*..... 72

3.1 Resumen	73
3.2 Abstract.....	74
3.3 Introducción.....	75
3.4 Materiales y métodos	76
3.4.1 Nanopartículas de óxido de zinc	76
3.4.2 Tratamientos aplicados de NPs-ZnO.....	76
3.4.3 Germinación de semillas	76
3.4.4 Parámetros evaluados durante el experimento	76
3.4.5 Determinación del contenido de clorofila y carotenoides.....	77
3.4.6 Contenido total de fenoles.....	77
3.4.7 Zinc.....	77
3.4.8 Análisis estadístico	77
3.5 Resultados y discusión.....	78
3.5.1 Efecto de NPs-ZnO en el vigor y germinación de las semillas de rábano	78
3.5.2 Peso fresco de plúmula y radícula	78
3.5.3 Longitud de radícula	79
3.5.4 Pigmentos fotosintéticos.....	80
3.5.5 Contenido de fenoles totales	81
3.5.6 Zinc.....	82
3.6 Conclusiones.....	83
3.7 Literatura citada.....	84

CAPÍTULO 4. IMPACTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS, OXIDATIVAS Y EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *Lactuca sativa* L. 87

4.1 Resumen	88
4.2 Abstract	89
4.3 Introducción.....	90

4.4 Materiales y métodos	92
4.4.1 Localización del experimento	92
4.4.2 Material vegetal y condiciones de cultivo	92
4.4.3 Sistema hidropónico NFT	94
4.4.4 Fitosanidad del cultivo	94
4.4.5 Variables evaluadas	94
4.4.5.1 Variables morfológicas	94
4.4.5.1.1 Número de hojas	94
4.4.5.1.2 Ancho de hoja	95
4.4.5.1.3 Largo de hoja	95
4.4.5.1.4 Altura de planta	95
4.4.5.1.5 Diámetro de corona de la planta	95
4.4.5.1.6 Longitud de raíz.....	95
4.4.5.1.7 Peso fresco de raíz.....	95
4.4.5.1.8 Peso seco de raíz.....	96
4.4.5.1.9 Peso fresco de vástago	96
4.4.5.1.10 Peso seco de vástago	96
4.4.5.2 Rendimiento	96
4.4.5.2.1 Peso fresco	96
4.4.5.2.2 Materia seca.....	96
4.4.5.3 Determinación de pigmentos fotosintéticos	97
4.4.5.4 Contenido de compuestos bioactivos	97
4.4.5.4.1 Contenido total de fenoles.....	97
4.4.5.4.2 Contenido total de flavonoides	97
4.4.5.4.3 Capacidad antioxidante	98
4.4.5.4.4 Contenido relativo de antocianinas	98
4.4.5.4.5 Contenido de vitamina C	99
4.4.5.5 Proteína.....	99
4.4.5.6 Actividad enzimática.....	99
4.4.5.6.1 Catalasa	99

4.4.5.6.2 Peroxidasa	100
4.4.5.6.3 Polifenol oxidasa	100
4.4.5.7 Cuantificación de zinc en las hojas	100
4.4.5.8 Expresión génica	101
4.4.5.8.1 Aislamiento de ARN total.....	101
4.4.5.8.2 Síntesis de ADNc por transcripción inversa	101
4.4.5.8.3 Análisis de expresión génica	101
4.4.5.9 Análisis estadístico	102
4.5 Resultados y discusión.....	103
4.5.1 Variables morfológicas	103
4.5.2 Rendimiento	105
4.5.3 Pigmentos fotosintéticos.....	106
4.5.4 Compuestos bioactivos	109
4.5.5 Actividad enzimática	112
4.5.6 Contenido de Zinc.....	114
4.5.7 Expresión génica.....	115
4.6 Conclusiones.....	121
4.7 Literatura citada.....	122
ANEXO A.....	127
ANEXO B.....	128

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro 1.1 Ingestas Dietéticas Recomendadas (IDR) de zinc.....	7
Cuadro 1.2. Concentración crítica de Zn en algunos cultivos, según diversos estudios.....	14
Cuadro 1.3. Métodos de síntesis de nanopartículas.	22
Cuadro 1.4. Las nanopartículas más utilizadas en la agricultura y su impacto en la mejora de la tolerancia de los cultivos al estrés abiótico.....	25
Cuadro 1.5. Clasificación botánica de la lechuga	34
Cuadro 1.6. Valor nutricional del cultivo de lechuga por cada 100 g de porción comestible.	36
Cuadro 2.1. Comparación de medias en la germinación, vigor, peso fresco de plúmula, raíz y la longitud de la raíz cuando se aplican NPs-ZnO.....	64
Cuadro 3.1. Comparación de medias en la germinación, vigor, peso fresco de plúmula, radícula y la longitud de la radícula de germinados de rábano cuando se aplican NPs-ZnO.	79
Cuadro 4.1. Distribución de los tratamientos del diseño experimental en lechugas producidas en sistema hidropónico NFT.	93
Cuadro 4.2. Secuencias de cebadores para análisis de qRT-PCR.....	102
Cuadro 4.3. Efecto de las NPs-ZnO sobre las variables morfológicas y de biomasa en las plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.).	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1.1. Participación de zinc en la generación y detoxificación de radicales superóxido, y efecto sobre las membranas biológicas y el metabolismo de las auxinas (IAA).	8
Figura 1.2. La deficiencia de Zn del suelo a nivel mundial	10
Figura 1.3. Factores que causan deficiencia de zinc en las plantas.....	11
Figura 1.4. Diferentes enfoques de biofortificación para la mejora del perfil nutricional....	17
Figura 1.5. Efectos de las nanopartículas en la salud de las plantas, el crecimiento y los parámetros fisiológicos.	23
Figura 1.6. Múltiples factores que afectan la absorción, translocación y penetración de nanopartículas en plantas.	24
Figura 1.7. Modelo propuesto de NPs-ZnO para minimizar los efectos adversos del estrés.	29
Figura 2.1. Caracterización de NPs-ZnO, a) difractograma de rayos X; b) imagen SEM; c) espectro UV-visible; y d) espectro FTIR.	63
Figura 2.2. Contenido de clorofila a (verde oscuro) y b (verde claro) (a) Contenido de carotenos (b) de <i>L. sativa</i> después de cada tratamiento.	65
Figura 2.3. Contenido de compuestos fenólicos totales de <i>L. sativa</i> después de cada tratamiento.	67
Figura 3.1. Contenido de clorofila (a) Contenido de carotenos (b) en germinados de rábano por efecto de la aplicación de NPs-ZnO.....	81
Figura 3.2. Contenido de fenoles totales en germinados de rábano cuando se aplican NPs-ZnO.	82
Figura 3.3. Contenido de zinc en germinados de rábano por efecto de la aplicación de NPs-ZnO.	83
Figura 4.1. Estructura del sistema hidropónico NFT, para producción de lechuga.	94

Figura 4.2. Biomasa fresca (a) y seca (b) (g) de plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO.	105
Figura 4.3. Pigmentos fotosintéticos de plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO.	107
Figura 4.4. Compuestos bioactivos de plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO.....	111
Figura 4.5. Actividad enzimática catalasa (a), peroxidasa (b), polifenol oxidasa (c) y contenido de proteína (d) de plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO.....	113
Figura 4.6. Contenido de zinc en las plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO.....	114
Figura 4.7. Electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa para la evaluación de la integridad y calidad del RNA total extraído de tejido foliar de <i>Lactuca sativa</i> tratado con NPsZnO.....	116
Figura 4.8. Validación de oligonucleótidos mediante PCR en gradiente para genes antioxidantes (LsCAT, LsPOD, LsSOD) y genes de referencia (LsTUB, LsGAPDH) en lechuga tratada con nanopartículas de óxido de zinc.....	117
118	
Figura 4.9. Variación en la expresión relativa de CAT (a), POD (b) y SOD (c) en las plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO..	118

INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción y distribución de alimentos a nivel mundial enfrenta desafíos cada vez mayores debido al cambio climático, el crecimiento de la población y la reducción de tierras cultivables (Seleiman *et al.*, 2020). Sin embargo, con recursos limitados y una población mundial proyectada de 9,600 millones de personas para el año 2050, existe una necesidad urgente del desarrollo de prácticas agrícolas más eficientes y sostenibles que contribuyan a mitigar la pobreza y el hambre en el mundo (Zulfiqar *et al.*, 2019). En este contexto, la agricultura continúa siendo un pilar fundamental en la economía de los países en desarrollo, desempeñando un rol crucial en su progreso (Alekhya *et al.*, 2024). La búsqueda por lograr un equilibrio nutricional óptimo en los cultivos se vuelve entonces esencial para asegurar una producción vegetal saludable y de alto rendimiento (Bernela *et al.*, 2021).

En este marco, la nanotecnología ha emergido como una herramienta innovadora con potencial para revolucionar la agricultura mediante la biofortificación de cultivos, una técnica prometedora que implica el uso de nanopartículas (NPs). Diversos estudios han reportado que las NPs pueden mejorar el crecimiento de las plantas, el contenido nutricional y estimular la actividad enzimática (Méndez-Arguello *et al.*, 2016). En particular, las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) han demostrado una influencia positiva sobre la reactividad de fitohormonas como el ácido indolacético, el cual regula procesos clave como la elongación y división celular. Asimismo, se ha observado que estas NPs inducen la biosíntesis de ácido salicílico, promoviendo respuestas fitoestimulantes en las plantas (Wang *et al.*, 2012).

El uso de NPs también ha sido asociado con una mejora en la germinación de semillas, la eficiencia fotosintética y la resistencia frente a patógenos (Pelegrino *et al.*, 2020), contribuyendo así al fortalecimiento de la seguridad alimentaria. Aunque, diversos estudios han destacado que la concentración de nanopartículas es un factor determinante: mientras que dosis bajas pueden promover el desarrollo vegetal, concentraciones elevadas pueden inducir efectos fitotóxicos (Méndez-Argüello *et al.*, 2016). Por ejemplo, Fortis-Hernández *et al.* (2024) evaluaron el impacto de la aplicación foliar de NPs-ZnO en *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* cultivada en

condiciones hidropónicas, su estudio reportó que una concentración de 40 mg L⁻¹ generó mejoras significativas en variables morfológicas, nutricionales y bioquímicas, incluyendo peso fresco, materia seca, contenido de zinc, clorofila total, carotenoides, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, flavonoides, vitamina C y las actividades de catalasa y peroxidasa.

No obstante, la aplicación de estas NPs también ha suscitado preocupaciones relacionadas con el estrés oxidativo inducido por la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual puede alterar funciones celulares críticas y provocar daño oxidativo y genético (Priyanka & Venkatachalam, 2016). Las plantas poseen un sistema antioxidante complejo para contrarrestar estos efectos, compuesto por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), que juegan un papel fundamental en la eliminación de ROS como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical superóxido (O₂⁻) (Anjum *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2021). Sin embargo, si bien se ha investigado el impacto a corto plazo de los nanomateriales en la actividad antioxidante, aún se requiere profundizar en estudios a largo plazo para comprender sus implicaciones fisiológicas y genómicas en cultivos agrícolas bajo distintas condiciones de manejo.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el impacto de NPs-ZnO sobre plantas de *Lactuca sativa* L., cultivadas en un sistema hidropónico NFT, utilizando al rábano *Raphanus sativus* L. como control de germinación. Para ello, la investigación se estructuró en cuatro capítulos. En el capítulo 1, se desarrolla una revisión de literatura sobre el uso de nanopartículas en la agricultura, su interacción con las plantas y los mecanismos involucrados. El capítulo 2, comprende la síntesis y caracterización de las NPs-ZnO, así como su evaluación preliminar en el crecimiento de plántulas de lechuga. El capítulo 3, se enfoca en la aplicación de las NPs-ZnO en germinados de rábano (*Raphanus sativus* L.). Finalmente, en el capítulo 4, se presenta la evaluación integral del efecto de las NPs-ZnO en plantas de lechuga a lo largo de su ciclo de cultivo hasta la cosecha, mediante la determinación de la actividad enzimática antioxidante asociada al estrés oxidativo, el contenido de pigmentos fotosintéticos, la acumulación de compuestos bioactivos, la expresión génica de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y POD), y la cuantificación de zinc en hojas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el impacto de la aplicación foliar de diferentes concentraciones de NPs-ZnO sobre la expresión génica, la actividad enzimática antioxidante, la calidad nutrimental y el contenido de zinc en plantas de lechuga cultivadas en un sistema hidropónico NFT, considerando al rábano en el control de germinación.

Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar las NPs-ZnO mediante un método de precipitación química controlada, y evaluar su efecto en el crecimiento de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).
2. Evaluar la respuesta fisiológica y antioxidante de germinados de *Raphanus sativus* L. frente a la aplicación de NPs-ZnO.
3. Determinar el efecto de la aplicación foliar de NPs-ZnO sobre el rendimiento, el contenido de pigmentos fotosintéticos, la acumulación de compuestos bioactivos, la expresión génica de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y POD), así como cuantificar el contenido de zinc en las plantas de lechuga.

HIPÓTESIS

La aplicación foliar de diferentes concentraciones de NPs-ZnO incrementa la expresión génica de enzimas antioxidantes, la actividad enzimática, la calidad nutrimental y el contenido del zinc en lechuga, mientras que los germinados de rábano permiten validar y comparar los efectos observados en la germinación de las semillas.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Zinc

El zinc (Zn), con número atómico de 30 y peso atómico de 65.37, es un metal de transición vital para el mundo vivo, micronutriente esencial en todos los sistemas biológicos, donde se encuentra en su forma oxidada como catión divalente (Zn^{2+}) (Stanton *et al.*, 2022). En comparación con otros metales de transición de primera fila, como el hierro (Fe) y el cobre (Cu), el Zn posee propiedades químicas distintivas que lo convierten en un cofactor catalítico muy versátil en proteínas, es el único metal representado en las seis clases de enzimas (número de la Comisión de Enzimas, EC 1–6; (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas). Es fundamental para el crecimiento y producción de plantas, así como para diversas actividades enzimáticas y proteicas que requieren su presencia en pequeñas cantidades (Al Jabri *et al.*, 2022). La importancia del Zn no solo se limita al ámbito vegetal, sino que también es esencial en la nutrición humana, ya que es necesario para el correcto funcionamiento del sistema inmunológico, síntesis de proteínas y crecimiento celular (Ho *et al.*, 2022). La deficiencia de Zn afecta a más de 3 mil millones de personas en todo el mundo (Reddy & Kumari, 2022) y es un problema de salud pública especialmente en países en desarrollo, esta deficiencia es la quinta causa de muerte y enfermedad; la razón principal parece ser la escasa diversidad dietética (Bouis & Saltzman, 2017). Afecta aproximadamente a un tercio de la población en todo el mundo, especialmente niños y mujeres embarazadas.

1.1.1 Importancia del zinc en la salud humana

Las recomendaciones dietéticas actuales indican que los hombres adultos deben consumir aproximadamente 11 mg de zinc al día, mientras que las mujeres requieren 8 mg. Durante el embarazo y la lactancia, estas cifras se elevan a entre 11 y 12 mg diarios. En el caso de los niños, la ingesta recomendada varía desde los 3 mg diarios en infantes de 7 meses a 3 años, hasta los 8 mg en niños de 9 a 13 años (Cuadro 1.1).

Las fuentes alimentarias más ricas en zinc incluyen la carne, el pescado y los mariscos (Ross *et al.*, 2020). Las ostras contienen más zinc por porción que cualquier otro alimento, pero la carne de res aporta el 20 % de la ingesta de zinc de los alimentos en Estados Unidos debido a su consumo común (Huth *et al.*, 2013). Los huevos y los productos lácteos también contienen zinc.

Las legumbres, los frutos secos y los cereales integrales contienen zinc, pero su biodisponibilidad es menor que la de los alimentos de origen animal debido a su contenido de fitatos.

Cuadro 1.1 Ingestas Dietéticas Recomendadas (IDR) de zinc.

Edad	Hombre (mg)	Mujer (mg)	Embarazo (mg)	Lactancia (mg)
Nacimiento a 6 meses*	2	2	—	—
7–12 meses	3	3	—	—
1–3 años	3	3	—	—
4–8 años	5	5	—	—
9–13 años	8	8	—	—
14–18 años	11	9	12	13
19 años o más	11	8	11	12

*Ingesta Adecuada (IA), equivalente a la ingesta media de zinc en lactantes sanos amamantados (Institute of Medicine, 2001).

1.1.2 El rol de zinc en la nutrición vegetal

El Zn es un elemento vital para las plantas, clasificado como un micronutriente debido a que se requiere en cantidades muy pequeñas, dentro de las plantas, el Zn se encuentra en forma iónica libre o asociado a diversos compuestos de bajo peso molecular (Brown *et al.*, 1993). Participa en numerosos procesos bioquímicos como el metabolismo de las auxinas, la producción de clorofila y la activación de distintas enzimas (como deshidrogenasas, aldolasas, isomerasas, transfosforilasas, ADN y ARN polimerasas) (Figura 1.1). Además, está involucrado en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Praharaj *et al.*, 2021). El Zn también participa en la síntesis de triptófano, la división celular y el mantenimiento de la membrana, estructura y fotosíntesis. Actúa como cofactor regulador en la síntesis de proteínas (Marschner, 2011). La regulación y el mantenimiento de la expresión génica necesaria para la tolerancia de las plantas al estrés ambiental dependen del Zn (Hafeez *et al.*, 2013).

Los iones de Zn también forman parte de la familia de factores de transcripción, conocidos como "dedos de zinc" que controlan la proliferación y diferenciación de las células (Palmer & Guerinot, 2009). Además de estas funciones, el Zn también tiene un papel importante en el desarrollo de los cloroplastos y algunas de sus funciones, como el proceso de reparación del fotosistema II por 'reciclado' de la proteína D1 dañada por la radiación luminosa o la actividad de la peptidasa SPP (Hansch & Mendel, 2009).

La concentración de Zn en las plantas presenta una variabilidad, no solo entre distintas especies o individuos, sino también entre tejidos, células e incluso compartimentos subcelulares. En la mayoría de los cultivos, una concentración foliar de Zn entre 15 y 20 mg kg⁻¹ es considerada adecuada para asegurar un crecimiento normal (Khan *et al.*, 2022).

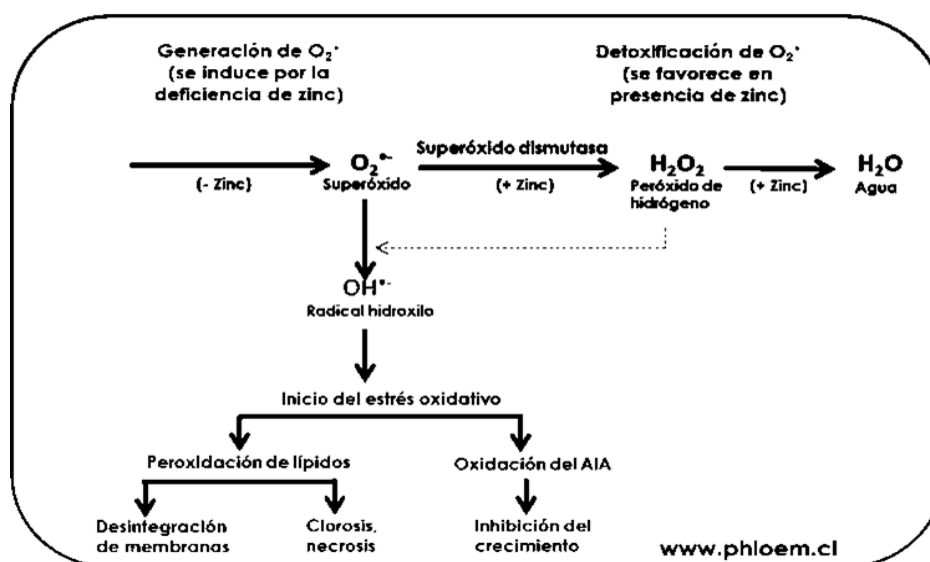


Figura 1.1. Participación de zinc en la generación y detoxificación de radicales superóxido, y efecto sobre las membranas biológicas y el metabolismo de las auxinas (IAA) (Adaptado de Broadley *et al.*, 2012).

1.1.3 Absorción de zinc en la planta

La adecuada absorción de Zn resulta fundamental para el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas. Su disponibilidad en el suelo está determinada por múltiples factores edáficos, entre

ellos el pH, la presencia de carbonato de calcio (CaCO_3), el contenido de materia orgánica y el tipo de cultivo establecido (Al Jabri *et al.*, 2022). Además, las interacciones entre los cultivares y la dinámica de nutrientes en el suelo también pueden influir en el contenido de Zn disponible para las plantas (Javed *et al.*, 2016).

El Zn es absorbido mayoritariamente por las raíces y se transporta hacia los órganos aéreos a través del flujo del xilema (Rizwan *et al.*, 2019). No obstante, también puede ser incorporado directamente a través de las hojas mediante la pulverización foliar (Paunov *et al.*, 2018). La absorción de Zn a través de las hojas se ve influenciada por factores como el espesor de la cubierta cerosa de la hoja, la composición química de la cutícula, la densidad de estomas y tricomas, entre otros.

La penetración foliar del Zn ocurre principalmente a través de la cutícula y/o los estomas. Mientras que los compuestos lipofílicos y no polares tienden a difundirse con mayor facilidad por la cutícula, los mecanismos de entrada de compuestos hidrofílicos y polares aún no están completamente esclarecidos (Fernández & Brown, 2013). Inicialmente, el Zn participa en la translocación de nutrientes a través de los espacios intercelulares, conocidos como apoplastos. En este compartimento, predominan cargas negativas debido a la presencia de grupos carboxilo libres provenientes de los ácidos galacturónicos, componentes esenciales de las pectinas en las paredes celulares primarias y láminas medias. Esta carga negativa favorece la retención de cationes, como el Zn^{2+} , Fe^{2+} o Ca^{2+} , lo que puede limitar su movilidad hacia otros tejidos vegetales (Sturikova *et al.*, 2018).

1.1.4 Importancia y disponibilidad de zinc en el suelo

La deficiencia de Zn en la nutrición humana está estrechamente vinculada al consumo de productos agrícolas pobres en este micronutriente, una situación que suele pasar desapercibida por gran parte de la población. En particular, las personas que presentan deficiencia grave de Zn suelen consumir granos de cereales cultivados en suelos pobres en este elemento lo que perpetúa el problema nutricional (Figura 1.2).

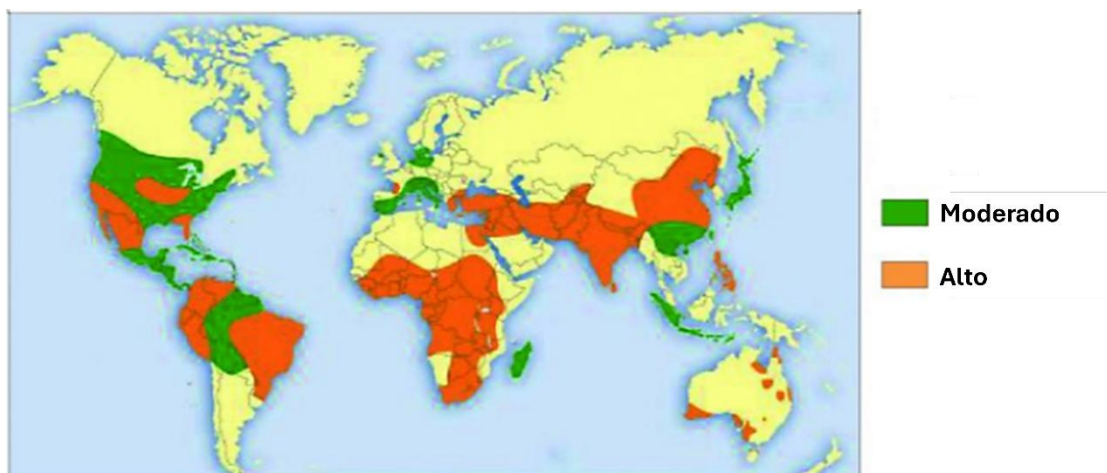


Figura 1.2. La deficiencia de Zn del suelo a nivel mundial (Adaptado de Singh *et al.*, 2023).

Las zonas áridas se caracterizan por su escasa disponibilidad de agua en el suelo, así como por altas tasas de evaporación y una intensa radiación solar. Estas condiciones favorecen la formación de suelos con características químicas particulares, como la acumulación de carbonatos y niveles elevados de alcalinidad, con valores de conductividad eléctrica que pueden alcanzar hasta 8 dS m^{-1} . En México, aproximadamente el 52% del territorio nacional se clasifica como árido o semiárido, abarcando principalmente entidades del norte como Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas (Anzaldo Montoya *et al.*, 2024).

En estas regiones, los suelos presentan múltiples limitaciones para la disponibilidad de micronutrientes esenciales como el zinc (Zn). La alta alcalinidad derivada de la acumulación de carbonatos, junto con la baja actividad biológica y la escasa presencia de materia orgánica, reduce la disponibilidad de Zn para los cultivos.

De acuerdo con análisis de laboratorio, más del 50% de los suelos agrícolas en México presentan niveles deficientes de Zn (INTAGRI, 2015). Esta deficiencia puede estar presente incluso sin manifestaciones visuales en los cultivos, pero puede ocasionar pérdidas de rendimiento de hasta un 20% (Cakmak, 2015). Aunque se suele asumir que los suelos ácidos favorecen la disponibilidad de Zn, esta no es una regla general.

1.1.5 Factores que causan deficiencia de zinc en las plantas

La deficiencia de Zn en las plantas es un problema nutricional complejo que afecta significativamente el crecimiento, el desarrollo y rendimiento de los cultivos. Según Khan *et al.* (2022), esta deficiencia se debe a múltiples factores interrelacionados (Figura 1.3), que incluyen tanto condiciones edáficas como fisiológicas y ambientales.

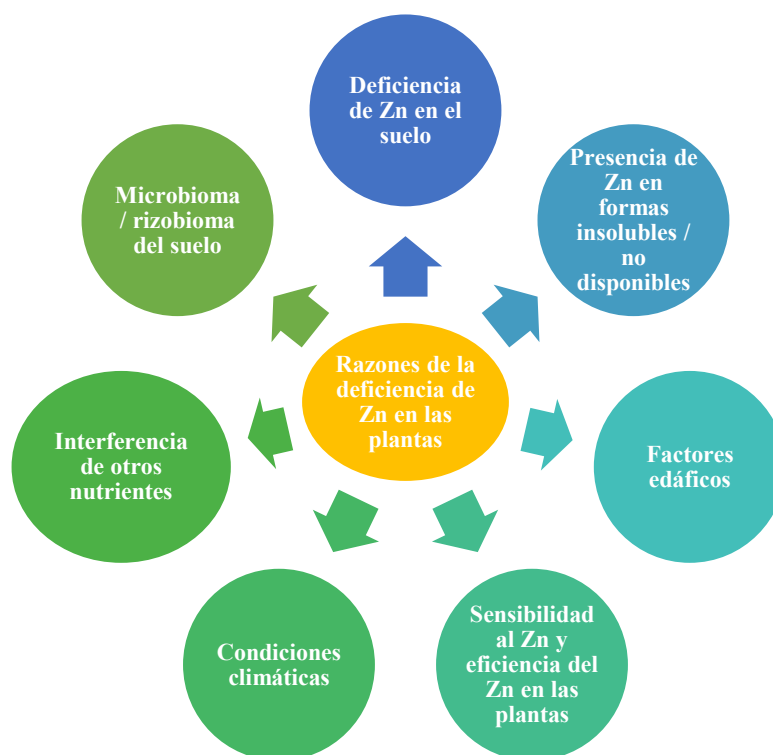


Figura 1.3. Factores que causan deficiencia de zinc en las plantas (Adaptado de Khan *et al.*, 2022).

Muchos suelos agrícolas presentan bajos niveles de Zn disponible, lo que limita su absorción por las plantas. Esta deficiencia puede deberse a la baja concentración total de Zn en el suelo o a su presencia en formas no disponibles para las plantas (Sharma *et al.*, 2013). Estas formas insolubles de Zn incluyen carbonato de Zn (ZnCO_3), óxido de Zn (ZnO) y sulfuro de Zn (ZnS). Los estudios afirman que la forma insoluble de Zn constituye $> 90\%$ del Zn del suelo, que no

está disponible para las plantas, mientras que el Zn intercambiable y soluble en agua constituye solo una fracción (4×10^{-10} – 4×10^{-6} M) (Gupta *et al.*, 2016).

Varios factores edáficos como el pH, la salinidad y la textura del suelo afectan la solubilidad y biodisponibilidad del Zn para las plantas. Dado que el Zn^{2+} se mantiene en la superficie de las partículas de arcilla, los suelos arcillosos y limosos tienden a contener más Zn disponible para las plantas que los suelos franco arenosos o arenosos. La alcalinidad del suelo ($\text{pH} > 6.5$) reduce la absorción de Zn por las plantas. Por lo tanto, los suelos calcáreos y arenosos con pH alcalino tienden a contener menos Zn disponible para las plantas. Desafortunadamente, el 30% de las tierras cultivables a nivel mundial son alcalinas (Cakmak & Kutman, 2018). Incluso si se añaden fertilizantes de Zn, como el sulfato de Zn, a suelos deficientes en este mineral, estos fertilizantes suelen transformarse nuevamente en compuestos insolubles como $\text{Zn}(\text{OH})$ y $\text{Zn}(\text{OH})_2$ a pH alcalino. En condiciones muy reducidas, como en los arrozales, el sulfato de Zn también puede convertirse en ZnS (Alloway, 2008).

Las plantas presentan diferentes niveles de sensibilidad ante la deficiencia de zinc; mientras que algunas son más susceptibles, otras muestran mayor tolerancia. Esta habilidad que tienen ciertas especies, genotipos o cultivares para desarrollarse adecuadamente y mantener una buena producción aun en condiciones de baja disponibilidad de zinc se denomina eficiencia en el uso de zinc por la planta (Hacisalihoglu & Kochian, 2003).

Además, las temperaturas frías disminuyen la absorción de zinc por las plantas, principalmente porque reducen la actividad microbiana en el suelo y limitan la transformación del zinc unido a materia orgánica en formas asimilables. A su vez, las bajas temperaturas influyen de manera indirecta en la disponibilidad de zinc al alterar otros procesos biogeoquímicos (Liu *et al.*, 2019).

Por otra parte, el microbioma del suelo, especialmente el rizobioma (microorganismos asociados a las raíces), cumple funciones clave tanto en la absorción como en la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Estos microorganismos, conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), no solo facilitan procesos como la fijación de nitrógeno, sino que también intervienen en diversas rutas metabólicas que favorecen el desarrollo de las plantas de manera sostenible. Gracias a los avances en técnicas de secuenciación y estudios ómicos, se

ha ampliado la comprensión sobre el papel integral y complejo que estos microbios desempeñan en la salud y productividad vegetal (Berg *et al.*, 2017).

1.1.6 Síntomas de deficiencia de zinc en plantas

Se han identificado numerosos cultivos que presentan síntomas claros de deficiencia severa de zinc (Sharma, 2006). Esta deficiencia aguda se manifiesta principalmente como necrosis en el ápice de las raíces, lo que implica una muerte regresiva del tejido. Por otro lado, una carencia moderada de zinc puede provocar clorosis irregular entre las nervaduras (hojas moteadas), así como la aparición de colores marrón rojizo o bronce en las hojas. También se observan síntomas similares a los provocados por la falta de auxinas, tales como entrenudos más cortos (rosetas), curvatura descendente de las hojas (epinastia), enrollamiento hacia adentro de la lámina foliar (hojas en forma de copa) y hojas más pequeñas de lo habitual (Broadley *et al.*, 2007).

La concentración de Zn varía de una planta a otra, de un tejido a otro, de una célula a otra e incluso de un compartimento a otro dentro de una célula. El contenido de Zn en las plantas varía entre 30 y 100 mg kg⁻¹ de materia seca (Cuadro 1.2). Está presente tanto en forma de Zn unido a proteínas como en forma de ion Zn²⁺ libre. Sin embargo, se desconoce qué proporción de Zn se encuentra en forma de Zn²⁺ libre y qué proporción de Zn existe en el Zn unido a proteínas (Broadley *et al.*, 2007). En la mayoría de los cultivos, la concentración de Zn en la hoja necesaria para un crecimiento adecuado oscila entre 15 y 20 mg kg⁻¹ de hojas. Sin embargo, cuando los contenidos de Zn en hojas caen por debajo de aproximadamente 15–20 mg kg⁻¹, es muy probable que aparezcan síntomas de deficiencia, especialmente clorosis intervenal y crecimiento atrofiado. Al mismo tiempo, la concentración de Zn en diversos compartimentos de las células foliares varía entre 74 y 3205 µg g⁻¹ de peso seco (Khan *et al.*, 2022).

Cuadro 1.2. Concentración crítica de Zn en algunos cultivos, según diversos estudios.

Cultivo	Tejido de referencia	Concentración (mg kg ⁻¹) Rango	Promedio	Sensibilidad a la deficiencia de zinc	Referencia
Trigo de primavera	Tejido más joven	15-70	14	Baja	(Brennan y Bolland, 2002)
Arroz	Lámina foliar	20-25	-	Alta	(Reuter y Robinson, 1997, Singh, 1984).
Cebada	Lámina foliar	-	20	Media	(Genc <i>et al.</i> , 2002)
Avena	Hojas superiores	-	5-20	Baja	
Lechuga	Hojas jóvenes	25-50	30	Media	

1.1.7 Respuestas de las plantas a la deficiencia de zinc

La deficiencia de iones de zinc en las plantas está relacionada con la interrupción de la actividad enzimática normal que, por ejemplo, conduce a la inhibición de la fotosíntesis. El zinc es un cofactor de la anhidrasa carbónica que aumenta el contenido de CO₂ en el cloroplasto y, por lo tanto, también aumenta la capacidad de carboxilación de la enzima rubisco. En el exterior, la falta de iones de zinc provoca diversas anomalías durante el desarrollo de la planta. En caso de una deficiencia aguda extensa, pueden aparecer los siguientes problemas: crecimiento enano, clorosis o, más precisamente, esterilidad de espiguillas en la familia *Poaceae* (Sharma *et al.*, 2013).

1.2 Biofortificación

La biofortificación es una estrategia orientada a mejorar la nutrición y la salud de las poblaciones cuya alimentación depende principalmente de cultivos básicos, mediante el aumento del contenido de micronutrientes en dichos cultivos (Oparinde & Birol, 2019). Actualmente, la investigación en este campo continúa en desarrollo y se ha centrado principalmente en enriquecer nutricionalmente cultivos de consumo masivo como el maíz, arroz, trigo, yuca, papa, boniato, frijol común, mijo perla, sorgo y plátano macho. Más recientemente, estos esfuerzos se han ampliado a hortalizas como la lechuga, el tomate, la zanahoria, así como a cultivos de semillas oleaginosas (Hotz, 2009).

Las iniciativas más consolidadas se han enfocado en incrementar el contenido de provitamina A (carotenoides), hierro y zinc, debido a la alta prevalencia de deficiencias de estos micronutrientes en países en vías de desarrollo. Paralelamente, se han comenzado a explorar otros objetivos nutricionales, como el aumento de minerales esenciales (calcio, yodo, magnesio, selenio), vitaminas (C, E, folato), carotenoides no provitamina A (como la luteína y el licopeno), así como la mejora de la calidad de las proteínas, el contenido de aminoácidos esenciales, ácidos grasos, y otros compuestos funcionales como flavonoides y prebióticos (inulina y fructanos) (Ofori *et al.*, 2022).

1.2.1 La biofortificación como estrategia para abordar las deficiencias globales de micronutrientes

De acuerdo con los datos de monitoreo rigurosamente recopilados por HarvestPlus (www.harvestplus.org), organización líder a nivel mundial en tecnologías y políticas de biofortificación, y con base en su modelo de proyecciones de alcance a nivel de hogares, para finales de 2020 más de 48 millones de personas cultivaban y consumían cultivos biofortificados en los países donde la organización tiene presencia (Harvestplus, 2021). No obstante, es probable que esta cifra sea aún mayor, ya que no contempla los esfuerzos de distribución realizados por otras entidades, como el Centro Internacional de la Papa (CIP), que promueve variedades de boniato anaranjado ricas en vitamina A (OSP), o World Vision, que distribuye diversos cultivos biofortificados en 18 países. A estos se suman también las acciones de gobiernos nacionales y

estatales (Saltzman *et al.*, 2017). A medida que más países de todo el mundo adoptan la biofortificación como parte de una estrategia más amplia para combatir las deficiencias de micronutrientes, HarvestPlus prevé que más de mil millones de personas se beneficiarán de alimentos biofortificados para 2030.

A diferencia de la suplementación y la fortificación industrial, la biofortificación busca beneficiar a comunidades rurales con acceso limitado a alimentos procesados, mediante el cultivo de variedades mejoradas nutricionalmente. Su sostenibilidad radica en la posibilidad de conservar y compartir las semillas biofortificadas, lo que reduce los costos a largo plazo.

1.2.2 Procesos utilizados para lograr la biofortificación

La biofortificación abarca diversos métodos orientados a incrementar la concentración de vitaminas y minerales en las partes comestibles de los cultivos, o bien a disminuir la presencia de antinutrientes, con el objetivo de mejorar el valor nutricional de los alimentos disponibles. De acuerdo a Jha & Warkentin (2020), la biofortificación se lleva a cabo mediante diferentes intervenciones (Figura 1.4):

Intervención agronómica

La biofortificación agronómica implica la aplicación de fertilizantes minerales al suelo o a los cultivos para aumentar la concentración y la bioaccesibilidad de nutrientes específicos (Nasim *et al.*, 2025). La efectividad de las intervenciones agronómicas depende de la composición del suelo, la solubilidad y movilidad de los minerales, la capacidad de los cultivos para absorberlos y la acumulación de minerales biodisponibles en niveles no tóxicos en las partes comestibles de los cultivos (Ofori *et al.*, 2022). La biofortificación agronómica abarca principalmente minerales y no vitaminas, ya que estas se sintetizan en los cultivos.

Genética (Fitomejoramiento)

El fitomejoramiento implica la producción de variedades de cultivos genéticamente diferentes o nuevas con mejoras en micronutrientes esenciales y ciertas características deseables (Dhaliwal

et al., 2022). Estos métodos mejoran el rendimiento, la resistencia a enfermedades y la adaptación a un ambiente en específico.

Ingeniería genética

La ingeniería genética implica obtener organismos modificados genéticamente y se basa en variaciones de tecnología transgénica para aumentar la disposición de las plantas para adquirir los microelementos y almacenarlos en partes comestibles de los cultivos (hojas, raíces, tallos, semillas, frutos y flores) (Wu *et al.*, 2015). Este tipo de biofortificación consiste en las modificaciones biotecnológicas que implican manipular, cambiar, eliminar o ajustar una determinada característica para mejorar la calidad nutritiva de algunas especies de plantas. (Garg *et al.*, 2018).

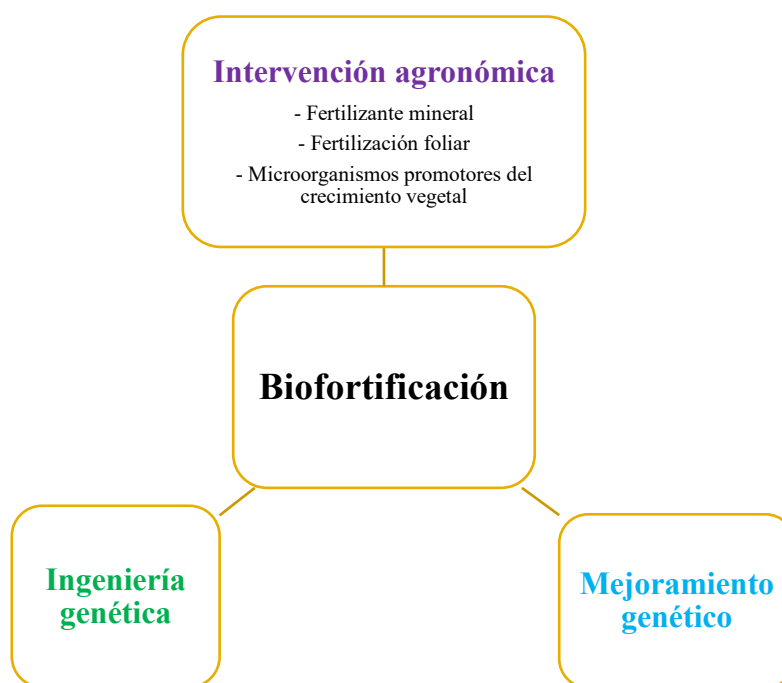


Figura 1.4. Diferentes enfoques de biofortificación para la mejora del perfil nutricional (Adaptado de Jha & Warkentin, 2020).

1.2.3 Compuestos bioactivos en cultivos biofortificados

Los compuestos bioactivos de las plantas se conocen como fitoquímicos. En un sentido estrictamente científico, un compuesto bioactivo es una sustancia con actividad biológica. Entre sus efectos positivos para la salud se encuentra la reducción del desarrollo de enfermedades crónicas, como el cáncer y la diabetes (Rivero-Montejo *et al.*, 2021). Estos beneficios para la salud se relacionan con las frutas y verduras y se atribuyen a las interacciones sinérgicas de los compuestos bioactivos presentes en los alimentos. Se han aislado e identificado más de 5000 fitoquímicos individuales en frutas, verduras y cereales (Liu, 2013). Entre los principales compuestos bioactivos se encuentran la vitamina C, el folato, la provitamina A, el potasio, el calcio, el magnesio, los flavonoides, los ácidos fenólicos, los alcaloides, los carotenoides y la fibra.

Los compuestos bioactivos representan un campo en expansión con múltiples aplicaciones industriales y médicas. Estas moléculas presentes en plantas encuentran utilidad en sectores como la medicina, farmacología, agroquímicos, cosmética, industria alimentaria y nanotecnología (Guaadaoui *et al.*, 2014). Estas sustancias se utilizan en productos agroalimentarios, perfumes, aromas, colorantes y preparaciones farmacológicas.

La función principal de los metabolitos secundarios es la protección de las plantas frente al ataque de insectos, animales y patógenos, o la supervivencia a otros estreses bióticos o abióticos (Shitan, 2016). Esto es importante para aumentar o potenciar la producción de estos compuestos. Una estrategia para aumentar la producción de estos compuestos es actuar sobre múltiples vías de transducción de señales en las plantas. Sin embargo, la producción de vías naturales por las plantas es baja y depende de diferentes características, como la etapa fisiológica y de desarrollo de la planta (Dixon, 2001). Además, una estrategia para aumentar gradualmente la producción de estos compuestos es la elicitación vegetal.

1.3 Nanotecnología: Nanopartículas como nuevos elicitores para la producción de compuestos bioactivos

El estrés es el principal método para la producción de metabolitos secundarios activos por las plantas y puede simularse utilizando diversos elicitores con defensas químicas activas en la planta. Estos elicitores pueden ser bioestimulantes (un producto formulado que puede mejorar la nutrición y la productividad de las plantas, entre otros) y estreses abióticos (Rivero-Montejo *et al.*, 2021). Una estrategia novedosa son las nanopartículas, que han demostrado su uso como elicitores en plantas.

1.3.1 Nanotecnología

La biofortificación de cultivos y la nanotecnología convergen en una innovadora estrategia para combatir la malnutrición a nivel global. Mientras que la biofortificación busca aumentar el contenido de micronutrientes esenciales en los alimentos durante el crecimiento de las plantas, la nanotecnología ofrece herramientas avanzadas como los nanofertilizantes, que permiten una liberación controlada y eficiente de nutrientes directamente en los tejidos vegetales (Avnee *et al.*, 2023). Esta sinergia no solo mejora la calidad nutricional de los cultivos, sino que también optimiza el uso de recursos agrícolas, promoviendo una agricultura más sostenible y orientada a la salud pública.

En este contexto, la nanotecnología ha ganado una atención creciente a lo largo del tiempo, siendo la ciencia que interviene en el diseño, la síntesis y el empleo de diversos nanomateriales. Tiene el potencial de revolucionar una serie de herramientas y procedimientos biotecnológicos para que sean portátiles, más seguros y fáciles de administrar. Las nanopartículas (NPs), con tamaños que oscilan entre 1 y 100 nanómetros, pueden estar compuestas de carbono, metales, óxidos metálicos o materia orgánica (Srilatha, 2011). Actualmente, se utilizan para diversos fines, desde tratamientos médicos, aplicaciones industriales y agrícolas, energía renovable, hasta su incorporación en materiales de uso diario como cosméticos, ropa, dispositivos ópticos, agentes bactericidas y componentes electrónicos, gracias a sus propiedades excepcionales, entre ellas, la actividad antibacteriana, alta resistencia a la oxidación y alta conductividad térmica (Ealia & Saravanakumar, 2017).

1.3.2 Clasificación de nanomateriales

Las NPs se pueden clasificar como orgánicas, inorgánicas o basadas en carbono. Las NPs orgánicas se pueden describir comúnmente como partículas sólidas compuestas por compuestos orgánicos (principalmente lípidos o poliméricos) (Allouche, 2012). Estas NPs son biodegradables, no tóxicas, y algunas partículas como las micelas y los liposomas tienen un núcleo hueco, también conocidas como nanocápsulas y son sensibles a la radiación térmica y electromagnética como el calor y la luz (Tiwari *et al.*, 2008). Las NPs inorgánicas se sintetizan a base de metal y óxidos metálicos. Los metales generalmente utilizados son plata (Ag), aluminio (Al), oro (Au), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Hong *et al.*, 2021), tienen propiedades distintivas tales como alta relación de área de superficie a volumen, tamaño de poro, carga de superficie y densidad de carga de superficie, estructuras cristalinas y amorfas, formas como esféricas y cilíndricas y color, reactividad y sensibilidad a factores ambientales como el aire, la humedad, el calor y la luz solar, etc. (Ealia & Saravanakumar, 2017). A base de óxidos metálicos, se sintetizan para modificar las propiedades de sus respectivas nanopartículas de base metálica (Tai *et al.*, 2007). Por ejemplo, las nanopartículas de hierro (Fe) se oxidan instantáneamente a óxido de hierro (Fe_2O_3) al exponerse al oxígeno a temperatura ambiente, lo que incrementa su reactividad en comparación con las nanopartículas metálicas no oxidadas. Entre los óxidos metálicos más comúnmente sintetizados se encuentran el óxido de aluminio (Al_2O_3), óxido de cerio (CeO_2), óxido de hierro (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4), dióxido de silicio (SiO_2), óxido de titanio (TiO_2), óxido de magnesio (MgO) y óxido de zinc (ZnO). Por otro lado, las NPs basadas en carbono están compuestas completamente de carbono, como los fullerenos, el grafeno, nanotubos de carbono y nanofibras de carbono (Hong *et al.*, 2021).

1.3.3 Métodos de síntesis de nanopartículas

Las propiedades deseadas de los nanomateriales, particularmente su tamaño y características fisicoquímicas, determinan el método de selección para sintetizar nanopartículas. Las nanopartículas se pueden sintetizar mediante varios métodos:

(a) Enfoque descendente, de arriba hacia abajo (Top-down)

El enfoque descendente para la síntesis de nanomateriales parte de estructuras macroscópicas que se reducen a escala nanométrica mediante procesos físicos como la molienda mecánica, la ablación láser o la deposición física de vapor, se basa principalmente en el procesamiento en estado sólido, donde los materiales se fragmentan en partículas más pequeñas (Khan, 2020). Aunque este método es útil para la experimentación en laboratorio, presenta varias limitaciones: suele generar partículas con una distribución de tamaños amplia y defectos estructurales, lo que afecta sus propiedades fisicoquímicas.

(b) Enfoque ascendente, de abajo hacia arriba (Bottom-up)

El enfoque ascendente en la síntesis de nanomateriales implica la construcción de materiales átomo por átomo o molécula por molécula, y es el método más utilizado para sintetizar una amplia variedad de nanomateriales. Destaca por su capacidad para producir partículas uniformes en tamaño, forma y distribución, gracias al control preciso del proceso de síntesis química. Este control meticuloso permite evitar el crecimiento no deseado de partículas y obtener materiales con características optimizadas (Patil *et al.*, 2021). Entre los métodos más comunes en este enfoque se encuentran: Síntesis sol-gel, precipitación coloidal, síntesis hidrotermal, ruta química organometálica y electrodeposición (Bokov *et al.*, 2021, Das & Pradhan, 2021).

(c) Enfoque de síntesis verde (biológica)

El enfoque de síntesis verde emplea organismos vivos como bacterias, algas, hongos y diversas angiospermas para producir nanopartículas de forma sustentable. Este método es considerado una alternativa ecológica, ya que ofrece ventajas significativas, como una menor toxicidad y un mayor respeto al medio ambiente en comparación con otros métodos de síntesis (Patel *et al.*, 2023).

El Cuadro 1.3, proporciona una visión general de los métodos disponibles, destacando la diversidad de técnicas que pueden aplicarse en función de los objetivos específicos de producción y las características deseadas de los nanomateriales.

Cuadro 1.3. Métodos de síntesis de nanopartículas (Al Jabri *et al.*, 2022; García-Ovando *et al.*, 2022).

Métodos de síntesis	
Métodos físicos	Método mecánico
	Ablación láser pulsado
	Método de descarga por alambre pulsado
	Deposición química de vapor
	Pirolisis por láser
	Deposición de haces de clústeres ionizados
Métodos químicos	Método Sol-gel
	Síntesis sonoquímica
	Método de coprecipitación
	Método de condensación de gas inerte
	Síntesis hidrotermal
Métodos biológicos	Síntesis utilizando microorganismos
	Síntesis utilizando extractos de plantas
	Síntesis utilizando algas

1.4 Efectos de las nanopartículas aplicadas en cultivos agrícolas

Las NPs son estructuras microscópicas que pueden ingresar a las plantas a través de los órganos superficiales como la cutícula, epidermis, estomas, hidatodos u otras aberturas como por los órganos subterráneos, incluidos los ápices radicales, la corteza, raíces laterales, o zonas lesionadas. Los efectos fisiológicos y morfológicos de las nanopartículas varían según la especie vegetal, el período de desarrollo, los agentes de desarrollo, el método de aplicación, la dosis y el tiempo de exposición (Figura 1.5) (El-Saadony *et al.*, 2022).

De acuerdo con la teoría del flujo de masa a baja presión, las NPs que entran a través de los estomas se movilizan por el floema gracias a las diferencias de presión entre hojas y raíces. La vía por la que las nanopartículas entran en las plantas altera muchos procesos vegetales, como la germinación, la actividad antioxidante, los macro y micronutrientes, el contenido de clorofila, el número de cloroplastos y la fotosíntesis (Cinisli *et al.*, 2019).

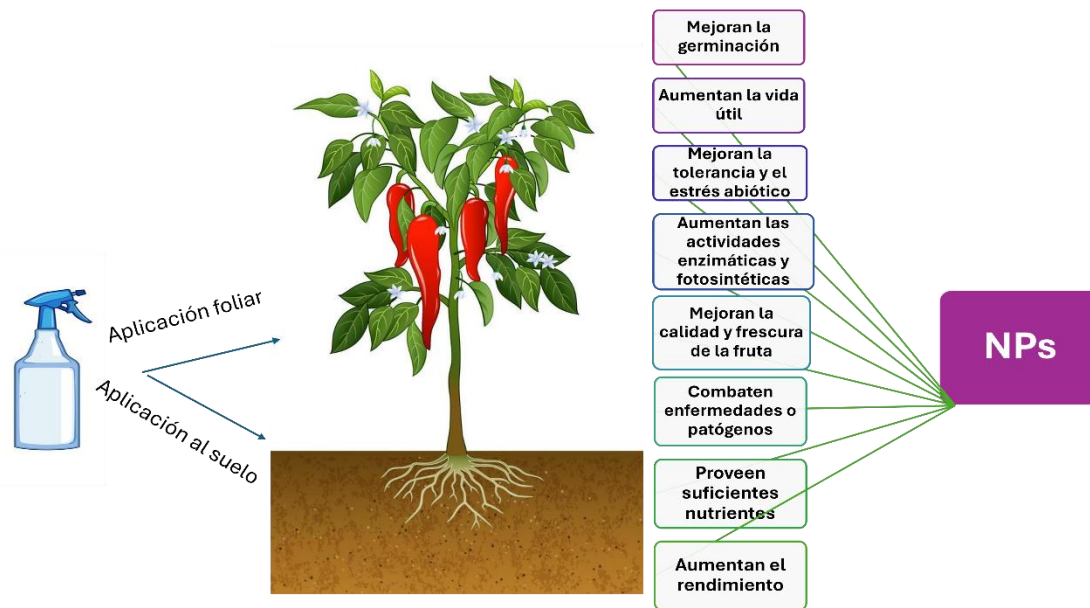


Figura 1.5. Efectos de las nanopartículas en la salud de las plantas, el crecimiento y los parámetros fisiológicos (Adaptado de El-Saadony *et al.*, 2022).

Las NPs pueden atravesar tanto la pared como la membrana celular, llegando a estructuras internas como la epidermis, el xilema, el cilindro central y las hojas (Tripathi *et al.*, 2017). Antes de llegar al cilindro central, las NPs se transportan pasivamente en la endodermis. Las NPs se transportan por vía activa a través de la presión osmótica, las fuerzas capilares, los poros de la pared celular y los plasmodesmos en las raíces de las plantas o por vía simplástica (Figura 1.6) (Usman *et al.*, 2020).

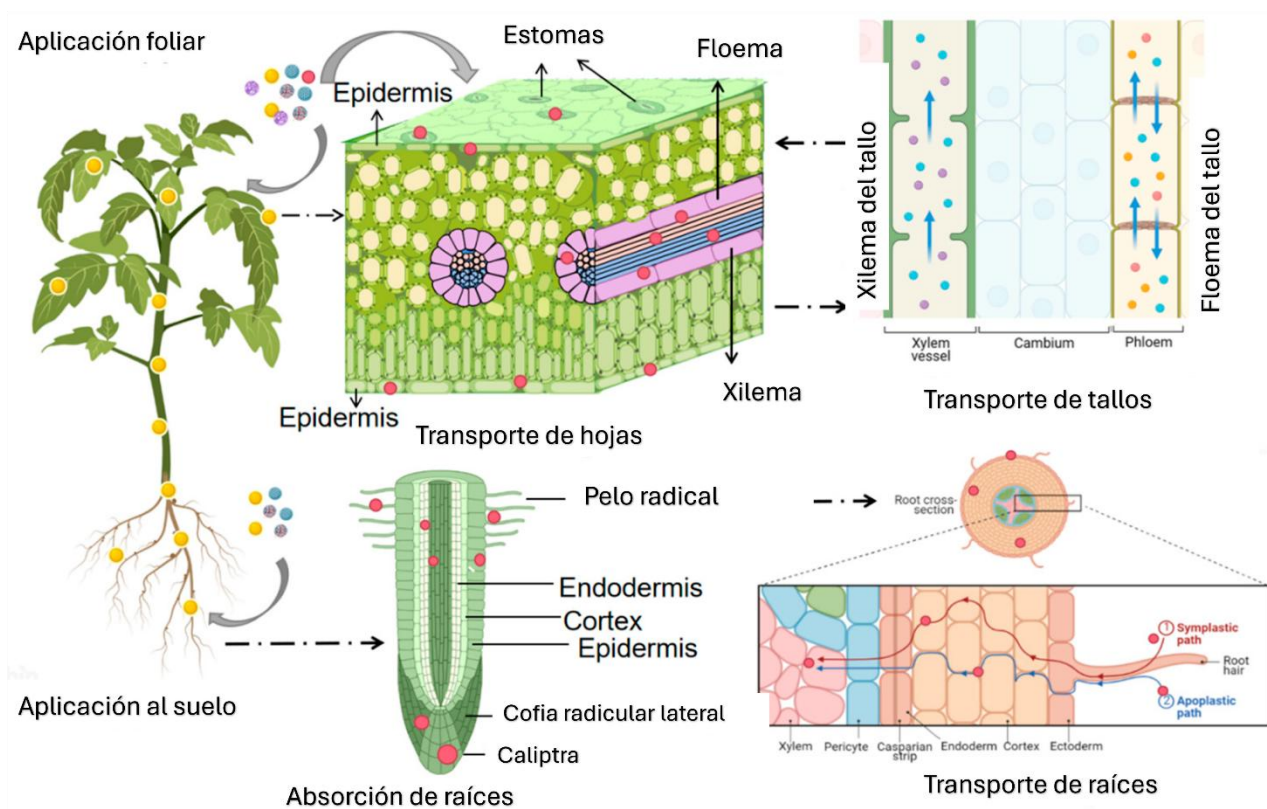


Figura 1.6. Múltiples factores que afectan la absorción, translocación y penetración de nanopartículas en plantas (Adaptado de Wang *et al.*, 2023).

Las NPs se transportan a través de los estomas cuando sus dimensiones son $< 15\text{-}40\text{ nm}$ (El-Saadony *et al.*, 2022). Las NPs ampliamente utilizadas en la agricultura y su papel en la mejora de la tolerancia de los cultivos al estrés abiótico se resumen en el Cuadro 1.4.

Cuadro 1.4. Las nanopartículas más utilizadas en la agricultura y su impacto en la mejora de la tolerancia de los cultivos al estrés abiótico.

Nanomaterial	Especie de cultivo	Concentración	Aplicación	Respuesta	Referencia
TiO ₂	<i>Spinacia oleracea</i>	Suspensión al 0,25%	Cebado de semillas y aspersión foliar	Mayor acumulación de biomasa, clorofila, N y contenido proteico	Yang <i>et al.</i> , 2007
CuO	<i>Solanum lycopersicum</i>	150-340 mL ⁻¹	µg Aplicación foliar	Enfermedad controlada eficazmente	Giannousi <i>et al.</i> , 2013
	<i>Capsicum annuum</i>	-	-	Aumento del nivel de peroxidación lipídica y del contenido de H ₂ O ₂ . Reducción de la expresión del gen de la mevalonato quinasa (MVK).	Djanaguiraman <i>et al.</i> , 2024
CeO ₂	<i>Canola</i>	200-1000 kg ⁻¹	mg En suelo	Barreras apoplásticas radiculares acortadas, lo que permite un mayor transporte de Na a los brotes y reduce su acumulación. Aumento de la biomasa vegetal y la eficiencia del aparato fotosintético.	Rossi <i>et al.</i> , 2016
	<i>Lemna minor</i> L	0-10 mg L ⁻¹	Suspensión en cajas Petri	Obstaculizó el alargamiento de la raíz.	Liu <i>et al.</i> , 2023
FeS ₂	<i>Cicer arietinum</i> ; <i>pinacia oleracea</i> ; <i>Daucus carota</i> , <i>Brassica juncea</i> y <i>Sesamum indicum</i>	80-100 µg mL ⁻¹	Cebado de semillas	Mayor germinación y rendimiento	Das <i>et al.</i> , 2016
MgO	<i>Solanum lycopersicum</i>	7-10 µg mL ⁻¹	Por método de empapado	Método de biocontrol mediante la supresión del patógeno <i>Ralstonia solanacearum</i>	Imada <i>et al.</i> , 2016
Quitosano	<i>Hordeum vulgare</i> L	30-90 mg kg ⁻¹	En suelo y aplicación foliar	Aumento del contenido de agua de la raíz (RWC), el peso del grano, la proteína del grano, el contenido de Pro y las	Behboudi <i>et al.</i> , 2018

					actividades de CAT y SOD.	
ZnO	<i>Triticum aestivum</i> L	10-1000 kg ⁻¹	mg	Suspensión macetas	en Producción de granos y biomasa mejoradas	Du <i>et al.</i> , 2019
	<i>Lactuca sativa</i> L	5-25 mg L ⁻¹		Aplicación foliar	Mejoró el contenido de Zn en el tejido vegetal	Fortis-Hernández <i>et al.</i> , 2022
Ag	<i>Vigna unguiculata</i>	30–90 µg mL ⁻¹		Aplicación foliar	Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas como <i>X. axonopodis</i> pv. <i>Malvacearum</i>	Vanti <i>et al.</i> 2019
Si	<i>Musa acuminata</i>	200-600 mg L ⁻¹		Añadido a la solución nutritiva de los brotes	Mantiene el equilibrio Na-K. Fomenta la fotosíntesis. Aumenta los niveles de clorofila y el crecimiento de las hojas.	Mahmoud <i>et al.</i> , 2020
Mn	<i>Capsicum annuum</i> L	0.1-1 mg L ⁻¹		Aplicación foliar	Germinación de semillas y crecimiento radicular mejorados. Expresión genética alterada.	Ye <i>et al.</i> , 2020
Y ₂ O ₃	<i>A. thaliana seedlings</i>	> 2 mM		-	Redució la expresión de genes relacionados con la síntesis de lignina y aumentó la vía de señalización del ácido abscísico y del etileno.	Wang <i>et al.</i> , 2023

1.4.1 Nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO)

El ZnO es un material inorgánico funcional, estratégico, prometedor y versátil con una amplia gama de aplicaciones. Se le conoce como semiconductor II-VI, ya que Zn y O se clasifican en los grupos dos y seis en la tabla periódica, respectivamente. El ZnO posee propiedades ópticas, de detección química, semiconductoras, de conductividad eléctrica y piezoeléctricas únicas. Aunque el ZnO muestra un carácter covalente ligero, tiene enlaces iónicos muy fuertes en el Zn–O. Su mayor durabilidad, mayor selectividad y resistencia al calor están precedidas de los materiales orgánicos e inorgánicos (Padmavathy & Vijayaraghavan, 2008). El ZnO posee una alta absorción óptica en las regiones UVA (315–400 nm) y UVB (280–315 nm), lo cual es

beneficioso en respuesta antibacteriana y se utiliza como protector UV en cosmética (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

Savi *et al.* (2012) realizaron la síntesis y caracterización de NPs-ZnO por la técnica sol-gel y utilizaron ZnCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ y NaOH como precursores a una temperatura de reacción de 50 °C y 90 °C (Savi *et al.*, 2012). Wang & Muhammed *et al.* (1999), realizaron la síntesis de NPs-ZnO, por el método de precipitación química para obtenerlas con morfología controlada, empleando ZnCl_2 y $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$ como reactivos de partida (Wang & Muhammed, 1999). Además, Zhang *et al.* (2002) han sintetizado las morfologías en forma de flor, prisma, copos de nieve y varillas ZnO, a una temperatura alta de 180 °C durante 13 h (Zang *et al.*, 2002).

El ZnO exhibe tres estructuras cristalizadas a saber, wurtzita, mezcla de zinc blenda y una sal de roca que se observa ocasionalmente (Moezzi *et al.*, 2012). La estructura hexagonal de wurtzita, cada átomo de Zn tetraédrico está rodeado por cuatro átomos de oxígeno y viceversa, la estructura es termodinámicamente estable en un ambiente. La estructura de zinc blenda es metaestable y puede estabilizarse mediante técnicas de crecimiento.

El comportamiento de NPs-ZnO en plantas no está completamente claro; sin embargo, las propiedades optoelectrónicas, físicas y antimicrobianas de las NPs-ZnO ofrecen varios efectos positivos a las plantas (Faizan *et al.*, 2020). Las NPs-ZnO hasta una cierta concentración tienen la capacidad de mejorar el crecimiento (Faizan *et al.*, 2018), donde proporcionan Zn^{+2} como micronutriente. Varios informes sugieren que las NPs-ZnO mejoran el crecimiento y el desarrollo de la soja (Priester *et al.*, 2012), el pepino (Zhao *et al.*, 2013), el maní (Prasad *et al.*, 2012) y el guisante verde (Mukherjee *et al.*, 2014). Prasad *et al.* (2012) informan que las semillas de maní, cuando se trataron con 1000 mg kg^{-1} de NPs-ZnO (tamaño promedio ~25 nm), exhibieron una mayor tasa de germinación y un mayor vigor de las plántulas, junto con una floración temprana y un mayor contenido de clorofila en las hojas (Prasad *et al.*, 2012). Ramesh *et al.* (2014) informaron que bajas concentraciones de NPs-ZnO impartían un efecto beneficioso sobre la germinación de semillas en trigo (Ramesh *et al.*, 2014).

Fortis-Hernández *et al.* (2024) estudiaron los efectos de la aplicación foliar de NPs-ZnO en *Lactuca sativa* L. var. longifolia cultivada en un sistema hidropónico mediante la técnica de

película nutritiva. El estudio evaluó dosis de 10-40 mg L⁻¹ de nanopartículas. Cabe destacar que la dosis de 40 mg L⁻¹ de NPs-ZnO mostró mejoras significativas con respecto al control en todas las variables evaluadas, incluyendo peso fresco, materia seca, contenido de zinc, clorofila total, carotenoides totales, fenoles totales, capacidad antioxidante, flavonoides totales, vitamina C, catalasa y peroxidasa (Fortis-Hernández *et al.*, 2024).

Umar *et al.* (2021) evaluaron el efecto de las NPs-ZnO en comparación con el fertilizante convencional de sulfato de zinc (ZnSO₄) sobre el crecimiento y la biofortificación con zinc en maíz, mediante experimentos en maceta y campo. Ambos tratamientos mejoraron significativamente el crecimiento y los parámetros fisiológicos de las plantas; sin embargo, los mayores beneficios se observaron con la aplicación de ZnSO₄ y NPs-ZnO. Las nanopartículas no solo aumentaron la concentración de Zn en los brotes, sino también en los granos, especialmente con la aplicación foliar, que logró un incremento de hasta un 82% en la concentración de Zn en el grano. En campo, se evidenció una redistribución del zinc en la planta durante la madurez, con disminuciones en tallos y hojas maduras, pero con acumulación notable (~80 mg kg⁻¹) en hojas jóvenes durante la etapa vegetativa (Umar *et al.*, 2021). Estos resultados destacan que las nanopartículas de ZnO constituyen una alternativa eficiente y económica para mejorar el rendimiento del cultivo y lograr una biofortificación efectiva con zinc en maíz, particularmente en suelos deficientes del micronutriente.

1.4.2 Impacto de las nanopartículas en el sistema antioxidante de las plantas

Las NPs modulan la fisiología de las plantas de cultivo. Afectan el proceso fisiológico al alterar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el metabolismo antioxidante (Hong *et al.*, 2021) y cambiar la fotosíntesis de las plantas al afectar los pigmentos, los fotosistemas y el contenido de proteínas de las hojas. Los ROS son muy dañinos para las células vegetales; ejemplos de ROS incluyen radical alcoxi (RO'), oxígeno singlete (¹O₂), radical hidroxilo (OH'), radical superóxido (O₂'-) y radical peroxi (ROO'). El metabolismo o la respiración celular producen ROS y en condiciones normales, varios sistemas de defensa antioxidante compuestos de moléculas enzimáticas (CAT, POD y SOD) y no enzimáticas (prolina, compuestos fenólicos) eliminan los ROS para aliviar el estrés. Pero la producción de ROS aumenta bajo estrés, por lo

que no se eliminan adecuadamente en una condición de estrés que perturba la célula vegetal. Todas las macromoléculas presentes en la célula son atacadas por ROS, lo que resulta en una disfunción del sistema metabólico y la muerte de la célula. Los ROS son sobreproducidos por el estrés abiótico que causa un daño celular grave (Khan & Upadhyaya, 2019), por lo tanto, las actividades de las enzimas antioxidantes aumentan por las NPs. Este efecto depende del tipo y concentración de NPs.

Las NPs-ZnO juegan un papel importante en las plantas para minimizar los efectos nocivos de ROS a los orgánulos celulares. Aparte de sus efectos dañinos bien documentados, los ROS también son conocidos por activar varios sistemas de defensa mediante la activación de una cascada de señalización celular e inducir o suprimir la expresión de muchos genes. Las NPs-ZnO juegan un papel importante en la protección de las plantas contra diversos estreses abióticos al estimular las actividades de las enzimas antioxidantes y la acumulación de osmolitos, aminoácidos libres y nutrientes (Figura 1.7).

La aplicación de NPs-ZnO a bajas concentraciones fue encontrado eficaz para aliviar diversos estreses abióticos y mejorar el crecimiento de las plantas y desarrollo. Por el contrario, sin embargo, un número significativo de estudios muestran efectos tóxicos de NPs-ZnO (Faizan *et al.*, 2020).

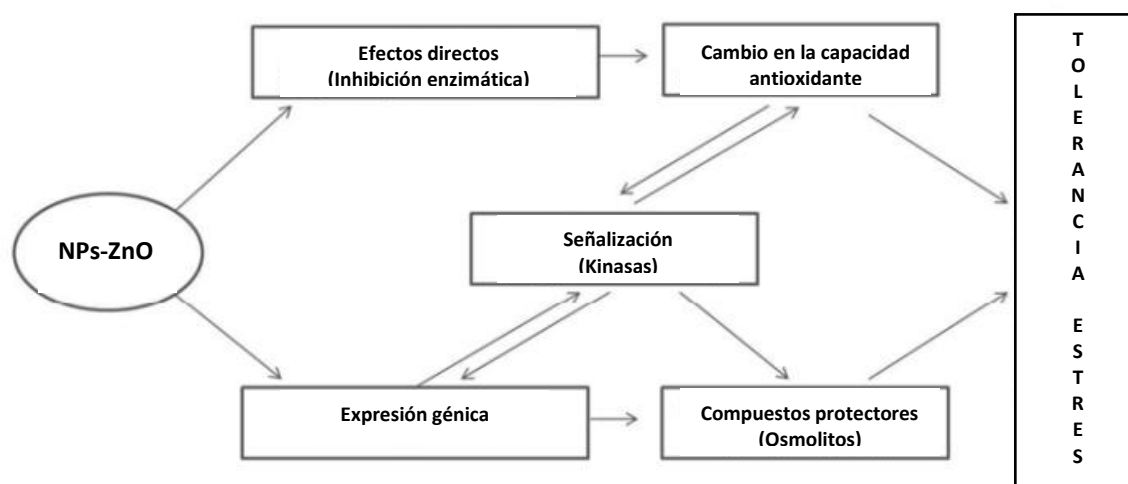


Figura 1.7. Modelo propuesto de NPs-ZnO para minimizar los efectos adversos del estrés. (Adaptado de Faizan *et al.*, 2020).

1.4.2.1 Moléculas enzimáticas

Catalasa (CAT)

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una hemoproteína formada por cuatro tetrámeros, que convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 . Fue el primer antioxidante enzimático en ser descrito. Aunque las plantas poseen otros tipos de enzimas capaces de degradar el H_2O_2 , las catalasas cuentan con la peculiaridad de no necesitar un sustrato reductor. Se generan mayormente en el peroxisoma (Sharma *et al.*, 2012).

Peroxidasa (POD)

La peroxidasa (EC 1.11.1.7) es una de las enzimas que controlan el crecimiento fisiológico de las plantas, su diferenciación y desarrollo. Es bien conocido que esta enzima participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropanocarboxílico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos, la oxidación de ácido indolacético, etc. (Sakharov *et al.*, 1999).

Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) es la enzima antioxidante responsable de la dismutación del anión superóxido altamente reactivo en O_2 y en la especie menos reactiva H_2O_2 (Alici & Arabaci, 2016). Existen tres formas de la enzima, clasificadas por los iones metálicos presentes en el sitio activo: cobre / zinc (CuZnSOD), manganeso (MnSOD) y hierro (FeSOD). Estas diferentes enzimas son distribuidas en diferentes ubicaciones subcelulares, presumiblemente porque O_2^- , no puede atravesar membranas y, por lo tanto, debe tratarse en sus sitios de producción (Bowler *et al.*, 1994).

1.4.2.2 Expresión génica

El análisis del perfil de expresión génica se ha convertido en una herramienta clave para comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la respuesta de las plantas frente a diversos estímulos ambientales, incluidos aquellos inducidos por NPs. En particular, las técnicas de RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real) han demostrado ser altamente sensibles y específicas para detectar cambios en la transcripción de genes involucrados en el estrés oxidativo, la homeostasis metálica y la señalización celular (Deepak *et al.*, 2007).

No obstante, la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante qRT-PCR depende en gran medida de la selección adecuada de genes de referencia para la normalización de la expresión génica. Estos genes deben mostrar una expresión estable tanto en condiciones controladas como experimentales. Entre los genes comúnmente empleados se encuentran gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina (ACT), tubulina alfa (TUB- α), tubulina beta (TUB- β), factor de elongación de la traducción (EF1- α), enzima conjugadora de ubiquitina (UBC), ARN ribosomal 18S (ARNr18S), proteína quinasa 6 activada por mitógenos (MPK6) y ARN ribosomal 25S (ARNr25S). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que su estabilidad puede variar significativamente según la especie vegetal y el tipo de estrés al que se expongan (Selvakesavan *et al.*, 2020).

Por ejemplo, EF1- α ha mostrado alta estabilidad bajo estrés térmico, mientras que el gen del factor de ribosilación de ADP 1 (ADP) es el más estable bajo condiciones salinas en *Hordeum brevisubulatum*, y CYP23 en *Calotropis procera* sometida a estrés salino. Se ha demostrado que el gen GAPDH es el gen de referencia más fiable para el estrés por frío, mientras que es menos estable bajo estrés por calor en plantas de *Hypericum perforatum* (Zhou *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018).

Estas variaciones en la expresión de los genes constitutivos en diferentes condiciones resaltan la necesidad de evaluar la estabilidad génica en cada condición experimental antes de utilizar los genes para la normalización de la expresión génica diana en el análisis de qRT-PCR. A pesar del creciente interés por entender la respuesta transcriptómica de las plantas a la exposición de

NPs, aún no se ha establecido una estandarización formal de genes de referencia específicos para este tipo de estudios. En este sentido, los sistemas de cultivo *in vitro*, como el cultivo de células vegetales, representan una alternativa prometedora al permitir condiciones más controladas y minimizar la interferencia estructural y ambiental inherente a los tejidos completos. Esto facilita el análisis preciso de los efectos inducidos por las NPs a nivel celular. Además, estos sistemas pueden emplearse para explorar el potencial de las NPs como elicitores de metabolitos secundarios.

En el estudio de Selvakesavan *et al.* (2020), se evaluó la estabilidad de expresión de varios genes constitutivos utilizados como referencia en análisis de expresión génica por qRT-PCR en células vegetales tratadas con nanopartículas metálicas. Para ello, se emplearon cultivos de suspensión celular de *Hypericum perforatum* expuestos a 25 mg L⁻¹ de nanopartículas de plata y oro (14–15 nm), y se recolectaron muestras celulares a 0.5, 4 y 12 horas tras el tratamiento. Los genes ACT2, ACT3, ACT7, EF1- α , GAPDH, H2A, TUB- α , TUB- β y ARNr18S fueron analizados mediante qRT-PCR y evaluados con algoritmos estadísticos (geNorm, NormFinder, BestKeeper y RefFinder) para determinar su estabilidad. Los resultados mostraron que EF1- α presentó la mayor estabilidad tanto en tratamientos con NP de oro como de plata, mientras que TUB- α fue estable únicamente bajo exposición a NP de plata. Sin embargo, ningún gen mantuvo una expresión consistentemente estable en todas las condiciones, lo que resalta la necesidad de validar sistemáticamente los genes de referencia bajo tratamientos con NPs para asegurar la fiabilidad de los estudios de expresión génica.

Hossain *et al.* (2016) informaron sobre la regulación negativa del nivel de expresión del ARNm y la lipasa 5 del motivo GDSL en la soja tratada con 500 ppm de nanopartículas de ZnO.

Según un estudio de Nelson *et al.* (2016) y Wu *et al.* (2017), las nanopartículas de CeO₂ provocan estrés o una enzima antioxidante que imita su actividad en las células vegetales. Esto implicó una reducción en la producción de RuBisCo, un aumento en la producción de proteínas tilacoides dependientes de la luz, involucradas en la fotosíntesis, y cambios en la actividad enzimática en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Dos enzimas cruciales que

responden al estrés oxidativo, la ascorbato peroxidasa y la glutatión peroxidasa, se redujeron en *Phaseolus vulgaris*.

A nivel molecular en *Solanum lycopersicum* y frijol, así como a nivel del transcriptoma en *A. thaliana*, también se han observado respuestas alteradas de la enzima ascorbato peroxidasa (Daniel *et al.*, 2024). Sorprendentemente, se observó una regulación negativa de factores de transcripción como el factor de elongación 1- α , importantes para la biosíntesis y el recambio proteico, en las hojas y semillas de plantas de frijol tratadas con nanopartículas de CeO₂ de 125 a 500 mg kg⁻¹. En hojas y semillas de frijol, la lipoxigenasa, una proteína involucrada en la síntesis de ácidos grasos, la oxido-reductasa y la actividad de unión al hierro también se vieron disminuidas (Majumdar *et al.*, 2015). En comparación con el experimento controlado, las proteínas reguladas diferencialmente en las plantas progenitoras tratadas con nanopartículas de CeO₂ mostraron una regulación negativa predominante (Majumdar *et al.*, 2015).

1.5 El cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Las hortalizas son muy importantes en la dieta humana, porque son una valiosa fuente de nutrientes, incluyendo fibras, minerales, carbohidratos y fitoquímicos que se sabe que contribuyen a las propiedades relacionadas con la salud de los alimentos derivados de plantas. Por lo tanto, el cultivo de hortalizas de alta calidad es una de las metas más importantes de la agricultura actual para cumplir las necesidades de la creciente población y demanda de alimentos saludables. Entre las hortalizas, la lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una de las especies más populares en todo el mundo, cultivado en campo abierto o en un lugar protegido (Franzoni *et al.*, 2021).

Según información del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), México alcanzó en 2024 una producción de 512 mil toneladas de lechuga (SIAP, 2024). Las variedades predominantes en la producción nacional son la Orejona y la Romana, que en conjunto representan el 98% del total. El cultivo de lechuga se realiza en 22 entidades federativas. En México, la producción de lechuga permite encontrarla disponible todo el año, aunque existe mayor disponibilidad en dos periodos: de febrero a abril y de julio a agosto. En cuanto al

consumo interno, el consumo anual per cápita de lechuga en México es de aproximadamente 2.5 kilogramos (CEDRSSA, 2020).

La lechuga es una planta anual, autógama, perteneciente a la familia Asteraceae y cuyo nombre botánico es *Lactuca saliva* L. (Dfinnova, 2022). Su clasificación completa se muestra en el Cuadro 1.5.

Cuadro 1.5. Clasificación botánica de la lechuga (Dfinnova, 2022).

Categoría Taxonómica	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Cichorioideae
Tribu	Lactuceae
Género	<i>Lactuca</i>
Especie	<i>Lactuca sativa</i> L.

La lechuga presenta una gran diversidad, dado principalmente por los diferentes tipos de hojas y hábitos de crecimiento de las plantas. Esto ha llevado a diversos autores a distinguir variedades botánicas en la especie, existiendo varias que son importantes como cultivos hortícolas en distintas regiones del mundo.

El cultivo de lechuga se desarrolla en una temperatura óptima de 18 a 23 °C por el día y de 7 a 15 °C durante la noche, soporta temperaturas máximas de 30 °C y la mínima de 6 °C, es decir que el cultivo puede resistir a bajas temperaturas, con una humedad de 60 a 80%, este cultivo de lechuga se desarrolla mucho mejor en suelos franco-arenosos que presenten un buen drenaje (Chinacalle & Nuñez, 2024).

En el cultivo de lechuga, se pueden distinguir las siguientes etapas fenológicas (García, 2013).

Plántula (7 a 14 días): desde la germinación a la formación de las primeras hojas y el sistema de la raíz.

Crecimiento vegetativo (30 a 45 días): formación de las primeras hojas "verdaderas", donde se desarrollan las partes cosechables. Incluye la etapa de roseta, donde aparecen nuevas hojas y disminuye la relación largo-ancho de folíolos y de formación de la cabeza (cogollo), donde las hojas son más anchas que largas, curvadas por el eje de la nervadura central.

Floración y maduración: posterior a la cosecha para consumo. Se produce la elongación del tallo central y emisión de las inflorescencias.

1.5.1 Valor nutricional del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Al observar el Cuadro 1.6 describe el valor nutricional del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) por cada 100 gr en los cuales se detallan las proteínas, grasas, carbono, calcio, magnesio, entre otros que aportan a cada individuo que las consume.

Cuadro 1.6. Valor nutricional del cultivo de lechuga por cada 100 g de porción comestible.

Nutriente	Por 100 g	Nutriente	Por 100 g
Energía (Kcal)	17	Potasio (mg)	240
Proteínas (g)	1.5	Fósforo (mg)	30
Lípidos totales (g)	0.3	Selenio (µg)	1
AG saturados (g)	0.039	Tiamina (mg)	0.06
AG monoinsaturados (g)	0.012	Riboflavina (mg)	0.06
AG poliinsaturados (g)	0.16	Equivalentes niacina (mg)	0.6
ω-3 (g)*	—	Vitamina B6 (mg)	0.07
C18:2 Linoleico (ω-6) (g)	—	Folatos (µg)	34
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	Vitamina B12 (µg)	0
Hidratos de carbono (g)	1.4	Vitamina C (mg)	12
Fibra (g)	1.5	Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	29
Agua (g)	95.3	Vitamina D (µg)	0
Calcio (mg)	40	Vitamina E (mg)	0.5
Hierro (mg)	0.6	Sodio (mg)	9
Yodo (µg)	5	Zinc (mg)	0.3
Magnesio (mg)	12		

1.5.2 Producción del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en sistemas hidropónicos

La hidroponía es una alternativa viable y sostenible para la producción de hortalizas, ya que permite cultivar alimentos durante todo el año, en espacios reducidos y sin la necesidad de suelos fértiles. Entre sus principales ventajas se encuentran el control eficiente de plagas y enfermedades, el uso racional del agua, así como la posibilidad de establecer cultivos en regiones con condiciones climáticas adversas o suelos no aptos para la agricultura tradicional.

Además, este sistema promueve una mayor calidad en la producción, mejores rendimientos, un desarrollo acelerado de los cultivos y una reducción significativa en el uso de fertilizantes y plaguicidas (Beltrano & Giménez, 2015). El objetivo principal de la hidroponía es proporcionar a las raíces de las plantas una absorción óptima de nutrientes, lo que se logra al mantenerlas en contacto constante con una solución nutritiva balanceada y adaptada a sus necesidades fisiológicas. Esto se lleva a cabo mediante el uso de sustratos inertes o medios de crecimiento específicos que aseguran un entorno adecuado para el desarrollo vegetal (Beltrano & Giménez, 2015).

Uno de los sistemas hidropónicos más empleados para la producción de lechuga es el sistema NFT (por sus siglas en inglés *Nutrient Film Technique*), también conocido como Técnica de la Lámina Nutriente. En este sistema, una delgada película de solución nutritiva (aproximadamente de 0.5 a 1.0 cm de espesor) fluye de manera continua a través de canales de PVC con perforaciones superiores donde se insertan las plantas. La circulación de esta solución se logra mediante la inclinación de los tubos, que permite el flujo por gravedad, y el uso de una bomba que recircula los nutrientes desde el tanque de fertilización hasta el inicio de los conductos. Este método es especialmente adecuado para cultivos de hoja, como la lechuga, debido a su bajo requerimiento de soporte radicular y rápida tasa de crecimiento (Castañares, 2020).

El tamaño del mercado de la hidroponía en México alcanzó un valor de alrededor de USD 52.17 millones en 2024. Se estima que el mercado crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta de 11.20% durante el periodo de pronóstico 2025-2034, para alcanzar un valor de alrededor de USD 135.63 millones en 2034.

1.6 Literatura citada

- Al Jabri, H., Saleem, M. H., Rizwan, M., Hussain, I., Usman, K., & Alsafran, M. (2022). Zinc oxide nanoparticles and their biosynthesis: overview. *Life*, 12(4): 594. <https://doi.org/10.3390/life12040594>
- Alekhy, V., Rajalakshmi, B., Kochar, S., Khan, I., Paul, S., Alsalami, Z., & Arun, V. (2024). Nanofertilizers: Transforming Agriculture for Sustainable Food Production. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 507, p. 01062). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202450701062>
- Alici, E. H., & Arabaci, G. (2016). Determination of SOD, POD, PPO and cat enzyme activities in *Rumex obtusifolius* L. *Annual Research & Review in Biology*, 11(3): 1-7. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/29809>
- Allouche, J. (2012). Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods. *Nanomaterials: A Danger or a Promise? A Chemical and Biological Perspective*, 27-74. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4213-3_2
- Alloway, B. J. (2008). Zinc in soils and crop nutrition.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., & Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental science and pollution research*, 23, 19002-19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
- Anzaldo Montoya, M., Iraida Hernández-García, Y., Guillermo Hernández-Montiel, L., & Hernández-Adame, L. (2024). Agronanotechnology in the arid zones of northern Mexico: Research, challenges, and new trends. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 26. <https://doi.org/10.56890/jpacd.v26i.534>
- Avnee, Sood, S., Chaudhary, D. R., Jhorar, P., & Rana, R. S. (2023). Biofortification: an approach to eradicate micronutrient deficiency. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1233070. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1233070>

- Behboudi, F., Tahmasebi Sarvestani, Z., Kassaei, M. Z., Modares Sanavi, S. A. M., Sorooshzadeh, A., & Ahmadi, S. B. (2018). Evaluation of chitosan nanoparticles effects on yield and yield components of barley (*Hordeum vulgare* L.) under late season drought stress. *Journal of Water and Environmental Nanotechnology*, 3(1): 22-39. <https://doi.org/10.22090/jwent.2018.01.003>
- Beltrano, J. & O. Gimenez, D. (2015). Cultivo en hidroponía. La Plata, Argentina: D - Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Recuperado de pag. 23.
- Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS microbiology ecology*, 93(5), fix050. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix050>
- Bernela, M., Rani, R., Malik, P., & Mukherjee, T. K. (2021). Nanofertilizers: applications and future prospects. In *Nanotechnology*, 289-332. Jenny Stanford Publishing.
- Bokov, D., Turki Jalil, A., Chupradit, S., Suksatan, W., Javed Ansari, M., Shewael, I. H., & Kianfar, E. (2021). Nanomaterial by sol-gel method: synthesis and application. *Advances in materials science and engineering*, 2021(1): 5102014. <https://doi.org/10.1155/2021/5102014>
- Bouis, H. E., & Saltzman, A. (2017). Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global food security*, 12, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.009>
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., & Asada, K. (1994). Superoxide Dismutase in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3): 199–218. <https://dx.doi.org/10.1080/07352689409701914>
- Brennan, R. F., & Bolland, M. D. A. (2002). Relative effectiveness of soil-applied zinc for four crop species. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(7): 985-993. <https://doi.org/10.1071/EA01154>
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New phytologist*, 173(4): 677-702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>

- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In P. Marschner. Marschner's mineral nutrition of higher plants (191–248). Londres: Academic Press.
- Brown, P. H., Cakmak, I., & Zhang, Q. (1993). Form and function of zinc plants. In Zinc in Soils and Plants: Proceedings of the International Symposium on ‘Zinc in Soils and Plants’ held at The University of Western Australia, 27–28 September, (pp. 93-106). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Cakmak, I. (2015). Zinc para la producción global sustentable de cultivos y mejores dietas nutricionales. En Conferencia del Curso Internacional de Nutrición de Cultivos. Intagri. <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/la-importancia-del-zinc-en-las-plantas-y-su-dinamica-en-el-suelo> (verificado 22 abril 2025).
- Çakmak, İ., & Kutman, U. Á. (2018). Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. European journal of soil science, 69(1): 172-180. <https://doi.org/10.1111/ejss.12437>
- Castañares, J. L. (2020). El ABC de la Hidroponía. EEA AMBA.
- CDRSSA (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria)(2020).https://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/88Ana%CC%81lisis_produccion%CC%81n_consumo_hortalizas.pdf. (verificado 22 abril 2025).
- Chinacalle Ramírez, B. M., & Nuñez Parra, A. D. (2024). Evaluación de dos dosis de biofertilizantes en el desarrollo agronómico de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad crespa.
- Cinisli, K. T., Uçar, S., & Dikbaş, N. (2019). Nanomateriyallerin Tarımda Kullanımı. Yüzüncü Yıl University Journal of Agricultural Sciences, 29(4): 817-831. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.595658>
- Daniel, A. I., Hüsselmann, L., Shittu, O. K., Gokul, A., Keyster, M., & Klein, A. (2024). Application of nanotechnology and proteomic tools in crop development towards sustainable agriculture. Journal of Crop Science and Biotechnology, 27(3): 359-379. <https://doi.org/10.1007/s12892-024-00235-6>

- Das, C. K., Srivastava, G., Dubey, A., Roy, M., Jain, S., Sethy, N. K., & Das, M. (2016). Nano-iron pyrite seed dressing: a sustainable intervention to reduce fertilizer consumption in vegetable (beetroot, carrot), spice (fenugreek), fodder (alfalfa), and oilseed (mustard, sesamum) crops. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 1, 1-12.
- Das, R. P., & Pradhan, A. K. (2021). An introduction to different methods of nanoparticles synthesis. *Bio-nano interface: applications in food, healthcare and sustainability*, 21-34. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2516-9_2
- Deepak, S. A., Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K. S., Iwahashi, H., ... & Agrawal, G. K. (2007). Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current genomics*, 8(4): 234-251. <https://doi.org/10.2174/138920207781386960>
- Dfinnova, (2022). La lechuga, el imprescindible del huerto. <https://dfinnova.com/2022/08/05/la-lechuga-el-imprescindible-del-huerto/> (verificado 22 abril 2025).
- Dhaliwal, S. S., Sharma, V., Shukla, A. K., Verma, V., Kaur, M., Shivay, Y. S., ... & Hossain, A. (2022). Biofortification—A frontier novel approach to enrich micronutrients in field crops to encounter the nutritional security. *Molecules*, 27(4): 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules27041340>
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847. <https://doi.org/10.1038/35081178>
- Djanaguiraman, M., Anbazhagan, V., Dhankher, O. P., & Prasad, P. V. (2024). Uptake, translocation, toxicity, and impact of nanoparticles on plant physiological processes. *Plants*, 13(22): 3137. <https://doi.org/10.3390/plants13223137>
- Du, W., Yang, J., Peng, Q., Liang, X., & Mao, H. (2019). Comparison study of zinc nanoparticles and zinc sulphate on wheat growth: From toxicity and zinc biofortification. *Chemosphere*, 227, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.168>
- Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In *IOP conference series: materials science and*

engineering (Vol. 263, No. 3, p. 032019). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>

El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Najjar, A. A., Alzahrani, S. O., Alkhatib, F. M., Shafi, M. E., & Hassan, M. A. (2021). The use of biological selenium nanoparticles to suppress *Triticum aestivum* L. crown and root rot diseases induced by *Fusarium* species and improve yield under drought and heat stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8): 4461-4471. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.043>

El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Desoky, E. S. M., Babalghith, A. O., & AbuQamar, S. F. (2022). Role of nanoparticles in enhancing crop tolerance to abiotic stress: A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 946717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.946717>

Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S. T., & Hayat, S. (2018). Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*, 56, 678-686. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0717-0>

Faizan, M., Hayat, S., & Pichtel, J. (2020). Effects of zinc oxide nanoparticles on crop plants: A perspective analysis. *Sustainable agriculture reviews 41: nanotechnology for plant growth and development*, 83-99. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8_4

Fernández, V., & Brown, P. H. (2013). From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Frontiers in Plant Science*, 4, 289. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00289>

Fortis-Hernández, M., Garcia-Delgado, J. D., Preciado-Rangel, P., Trejo-Valencia, R., Sánchez-Estrada, A., & Fortiz-Hernández, J. (2022). Commercial and phytochemical quality in biofortified ‘Orejona’ lettuce with zinc oxide nanoparticles. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(4): 12969-12969. <https://doi.org/10.15835/nbha50312969>

Fortis-Hernández, M., Pivaral-Chávez, A. G., Galindo-Guzmán, A. P., Preciado-Rangel, P., Ruiz-Ortega, F. J., & Trejo-Valencia, R. (2024). Nanopartículas de óxido de zinc para incrementar

rendimiento, compuestos bioactivos y actividad enzimática en lechuga. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 11(1). <https://doi.org/10.19136/era.a11n1.3939>

Franzoni, G., Cocetta, G., & Ferrante, A. (2021). Effect of glutamic acid foliar applications on lettuce under water stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(5): 1059-1072. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00984-6>

Garcia Zumel, M. (2013). El cultivo de la lechuga. En: *Cultivos herbáceos intensivos*. E.T.S.1. I.A.A. de Palencia, Universidad de Valladolid, 32 pp.

García-Ovando, A. E., Piña, J. E. R., Naranjo, E. U. E., Chávez, J. A. C., & Esquivel, K. (2022). Biosynthesized nanoparticles and implications by their use in crops: Effects over physiology, action mechanisms, plant stress responses and toxicity. *Plant Stress*, 6, 100109. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100109>

Garg, M., Sharma, N., Sharma, S., Kapoor, P., Kumar, A., Chunduri, V. & Arora, P. (2018). "Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world", *Frontiers in Nutrition*, 5(12): 1-33. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00012>

Genc, Y., McDonald, G. K., & Graham, R. D. (2002). Critical deficiency concentration of zinc in barley genotypes differing in zinc efficiency and its relation to growth responses. *Journal of Plant Nutrition*, 25(3): 545-560. <https://doi.org/10.1081/PLN-120003381>

Giannousi K, Avramidis I, Dendrinou-Samara C (2013). Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. *RCS Adv* 3:21743– 21752. <https://doi.org/10.1039/c3ra42118j>

Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3): 174-179. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140303.16>

Gupta, N., Ram, H., & Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15: 89-109. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9390-1>

- Hacisalihoglu, G., & Kochian, L. V. (2003). How do some plants tolerate low levels of soil zinc? Mechanisms of zinc efficiency in crop plants. *New phytologist*, 159(2): 341-350. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00826.x>
- Hafeez, B. M. K. Y., Khanif, Y. M., & Saleem, M. (2013). Role of zinc in plant nutrition-a review. *American Journal of Experimental Agriculture* 3(2):374-391.
- Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3): 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>
- HarvestPlus, (2021). Crop Map. <https://www.harvestplus.org/harvestplus-biofortified-crops-map-and-table-updated-with-2020-data/> (verificado 22 abril 2025).
- Ho, E., Wong, C. P., & King, J. C. (2022). Impact of zinc on DNA integrity and age-related inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 178: 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.256>
- Hong, J., Wang, C., Wagner, D. C., Gardea-Torresdey, J. L., He, F., & Rico, C. M. (2021). Foliar application of nanoparticles: mechanisms of absorption, transfer, and multiple impacts. *Environmental Science: Nano*, 8(5): 1196-1210.
- Hossain, Z., Mustafa, G., Sakata, K., & Komatsu, S. (2016). Insights into the proteomic response of soybean towards Al₂O₃, ZnO, and Ag nanoparticles stress. *Journal of hazardous materials*, 304, 291-305. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.071>
- Hotz, C. (2009). The potential to improve zinc status through biofortification of staple food crops with zinc. *Food and Nutrition Bulletin*, 30(1_suppl1), S172-S178. <https://doi.org/10.1177/15648265090301S109>
- Huth, P. J., Fulgoni, V. L., Keast, D. R., Park, K., & Auestad, N. (2013). Major food sources of calories, added sugars, and saturated fat and their contribution to essential nutrient intakes in the US diet: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (2003–2006). *Nutrition journal*, 12, 1-10.

- Imada, K., Sakai, S., Kajihara, H., Tanaka, S., & Ito, S. (2016). Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Plant Pathology*, 65(4): 551-560. <https://doi.org/10.1111/ppa.12443>
- Institute of Medicine (2001). Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc Washington, DC: National Academy Press.
- INTAGRI. (2015). El Zinc en los Suelos Mexicanos. Serie Suelos. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 6: 6 <https://www.intagri.com/articulos/suelos/zinc-suelos-mexicanos> (verificado 22 abril 2025).
- Javed, H., Naeem, A., Rengel, Z., & Dahlawi, S. (2016). Timing of foliar Zn application plays a vital role in minimizing Cd accumulation in wheat. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 16432-16439.
- Jha, A. B., & Warkentin, T. D. (2020). Biofortification of Pulse Crops: Status and Future Perspectives. *Plants* (Basel, Switzerland), 9(1): 73. <https://doi.org/10.3390/plants9010073>
- Jin, Y., Liu, F., Huang, W., Sun, Q., & Huang, X. (2019). Identification of reliable reference genes for qRT-PCR in the ephemeral plant *Arabidopsis pumila* based on full-length transcriptome data. *Scientific Reports*, 9(1): 8408. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44849-1>
- Khan, S. T., Malik, A., Alwarthan, A., & Shaik, M. R. (2022). The enormity of the zinc deficiency problem and available solutions; an overview. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3): 103668. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103668>
- Khan, Z., & Upadhyaya, H. (2019). of Nanoparticles on Abiotic Stress Responses in Plants. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, 305–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811488-9.00015-9>
- Liu, D. Y., Liu, Y. M., Zhang, W., Chen, X. P., & Zou, C. Q. (2019). Zinc uptake, translocation, and remobilization in winter wheat as affected by soil application of Zn fertilizer. *Frontiers in Plant Science*, 10, 426. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00426>

- Liu, R.H. Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, (2013), 78, A18–A25.
- Liu, Y., Zhao, X., Ma, Y., Dai, W., Song, Z., Wang, Y., & Zhang, Z. (2023). Interaction of cerium oxide nanoparticles and ionic cerium with duckweed (*Lemna minor* L.): Uptake, distribution, and phytotoxicity. *Nanomaterials*, 13(18): 2523. <https://doi.org/10.3390/nano13182523>
- Mahmoud, L. M., Dutt, M., Shalan, A. M., El-Kady, M. E., El-Boray, M. S., Shabana, Y. M., & Grosser, J. W. (2020). Silicon nanoparticles mitigate oxidative stress of in vitro-derived banana (*Musa acuminata* ‘Grand Nain’) under simulated water deficit or salinity stress. *South African Journal of Botany*, 132: 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.027>
- Majumdar, S., Almeida, I. C., Arigi, E. A., Choi, H., VerBerkmoes, N. C., Trujillo-Reyes, J., ... & Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Environmental effects of nanocerium on seed production of common bean (*Phaseolus vulgaris*): a proteomic analysis. *Environmental science & technology*, 49(22): 13283-13293. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03452>
- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Méndez-Argüello BM, Lira-Saldivar RH, Vera-Reyes I. (2016). Respuestas fisiológicas de plantas cultivadas en bioespacios por efecto de nanofertilizantes y zeolita. *Agronano Tecnología*, México 62-79.
- Moezzi, A., McDonagh, A. M., & Cortie, M. B. (2012). Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. *Chemical engineering journal*, 185: 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.076>
- Mukherjee, A., Peralta-Videa, J. R., Bandyopadhyay, S., Rico, C. M., Zhao, L., & Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. *Metallomics*, 6(1): 132-138. <https://doi.org/10.1039/c3mt00064h>
- Nasim, A., Hao, J., Tawab, F., Jin, C., Zhu, J., Luo, S., & Nie, X. (2025). Micronutrient Biofortification in Wheat: QTLs, Candidate Genes and Molecular Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(5): 2178. <https://doi.org/10.3390/ijms26052178>

- Nelson, B. C., Johnson, M. E., Walker, M. L., Riley, K. R., & Sims, C. M. (2016). Antioxidant cerium oxide nanoparticles in biology and medicine. *Antioxidants*, 5(2): 15. <https://doi.org/10.3390/antiox5020015>
- Ofori, K. F., Antoniello, S., English, M. M., & Aryee, A. N. (2022). Improving nutrition through biofortification—A systematic review. *Frontiers in Nutrition*, 9: 1043655. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1043655>
- Oparinde, A., & Birol, E. (2019). Value of nutrition: a synthesis of willingness to pay studies for biofortified foods. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22451-7>
- Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and technology of advanced materials*. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/9/3/035004>
- Palmer, C. M., & Guerinot, M. L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature chemical biology*, 5(5): 333-340. <https://doi.org/10.1038/nchembio.166>
- Patel, C., Singh, J., Karunakaran, A., & Ramakrishna, W. (2023). Evolution of nano-biofertilizer as a green technology for agriculture. *Agriculture*, 13(10): 1865. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101865>
- Patil, N., Bhaskar, R., Vyavhare, V., Dhadge, R., Khair, V., & Patil, Y. (2021). Overview on methods of synthesis of nanoparticles. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 13(2): 11-16. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2021v13i2.41556>
- Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., & Goltsev, V. (2018). Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. *International journal of molecular sciences*, 19(3): 787. <https://doi.org/10.3390/ijms19030787>
- Pelegriño, M. T., Kohatsu, M. Y., Seabra, A. B., Monteiro, L. R., Gomes, D. G., Oliveira, H. C., & Lange, C. N. (2020). Effects of copper oxide nanoparticles on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings and possible implications of nitric oxide in their antioxidative defense. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192: 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8188-3>

- Praharaj, S., Skalicky, M., Maitra, S., Bhadra, P., Shankar, T., Brestic, M., & Hossain, A. (2021). Zinc biofortification in food crops could alleviate the zinc malnutrition in human health. *Molecules*, 26(12): 3509.
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*, 35(6): 905-927. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>
- Priester, J. H., Ge, Y., Mielke, R. E., Horst, A. M., Moritz, S. C., Espinosa, K., & Holden, P. A. (2012). Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37): E2451-E2456. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205431109>
- Priyanka, N., & Venkatachalam, P. (2016). Biofabricated zinc oxide nanoparticles coated with phycomolecules as novel micronutrient catalysts for stimulating plant growth of cotton. *Advances in natural sciences: nanoscience and Nanotechnology*, 7(4): 045018. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/4/045018>
- Ramesh, M., Palanisamy, K., Babu, K., & Sharma, N. K. (2014). Effects of bulk & nano-titanium dioxide and zinc oxide on physio-morphological changes in *Triticum aestivum* Linn. *J Glob Bioscience*, 3(2): 415-422.
- Reddy, N. S., & Kumari, K. (2022). Importance of zinc in plant nutrition: a review. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environment Science*, 490-493. <http://doi.org/10.53550/AJMBES.2022.v24i03.008>
- Reuter, D., & Robinson, J. B. (Eds.). (1997). *Plant analysis: an interpretation manual*. CSIRO publishing.
- Rivero-Montejo, S. D. J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. (2021). Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture*, 11(2): 134. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020134>

- Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A., & Waris, A. A. (2019). Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere*, 214: 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120>
- Ross, A. C., Caballero, B., Cousins, R. J., & Tucker, K. L. (2020). *Modern nutrition in health and disease*. Jones & Bartlett Learning.
- Rossi, L., Zhang, W., Lombardini, L., & Ma, X. (2016). The impact of cerium oxide nanoparticles on the salt stress responses of *Brassica napus* L. *Environmental Pollution*. 219: 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.060>
- Sakharov, I. Y., Ardila, G. B., & Sakharova, I. V. (1999). Peroxidasa de plantas tropicales. *Revista Colombiana de Química*, 28(1): 97-106.
- Saltzman, A., Birol, E., Oparinde, A., Andersson, M. S., Asare-Marfo, D., Diressie, M. T., & Zeller, M. (2017). Availability, production, and consumption of crops biofortified by plant breeding: current evidence and future potential. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1390(1): 104-114. <https://doi.org/10.1111/nyas.13314>
- Savi, B. M., Rodrigues, L., & Bernardin, A. M. (2012). Síntesis de nanopartículas de ZnO por el proceso SOL-GEL. *Qualicer*, 12, 1-9.
- Seleiman, M. F., Almutairi, K. F., Alotaibi, M., Shami, A., Alhammad, B. A., & Battaglia, M. L. (2020). Nano-fertilization as an emerging fertilization technique: Why can modern agriculture benefit from its use?. *Plants*, 10(1): 2. <https://doi.org/10.3390/plants10010002>
- Sharma, A., Patni, B., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2013). Zinc—an indispensable micronutrient. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19: 11-20. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0139-1>
- Sharma, C. P. (2006). *Plant micronutrients*. CRC Press.

- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012(1): 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shitan, N. (2016). Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(7): 1283-1293. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1151344>
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2024). Cultivo de lechuga. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (verificado 26 julio 2025).
- Singh, K. (1984). Determination of critical limit of zinc in rice soils in India for predicting response of rice to zinc application. *Field Crops Research*, 9: 143-149. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(84\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0378-4290(84)90020-0)
- Singh, S., Kaur, J., Ram, H., Singh, J., & Kaur, S. (2023). Agronomic bio-fortification of wheat (*Triticum aestivum* L.) to alleviate zinc deficiency in human being. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 22(2): 505-526.
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*, 7(3): 219-242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Srilatha, B. A. R. N. (2011). Nanotechnology in agriculture. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 2(7): 5. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000123>
- Stanton, C., Sanders, D., Krämer, U., & Podar, D. (2022). Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification. *Molecular Plant*, 15(1): 65-85. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.008>
- Sturikova, H., Krystofova, O., Huska, D., & Adam, V. (2018). Zinc, zinc nanoparticles and plants. *Journal of hazardous materials*, 349: 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.040>

- Tai, C. Y., Tai, C. T., Chang, M. H., & Liu, H. S. (2007). Synthesis of magnesium hydroxide and oxide nanoparticles using a spinning disk reactor. *Industrial & engineering chemistry research*, 46(17): 5536-5541. <https://doi.org/10.1021/ie060869b>
- Tiwari, D. K., Behari, J., & Prasenjit Sen, P. S. (2008). Application of nanoparticles in waste water treatment.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C., & (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 110: 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030>
- Umar, W., Hameed, M. K., Aziz, T., Maqsood, M. A., Bilal, H. M., & Rasheed, N. (2021). Synthesis, characterization and application of ZnO nanoparticles for improved growth and Zn biofortification in maize. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 67(9): 1164-1176. <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1782893>
- Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., Rehman, H., & (2020). Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*. 721:137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>
- Vanti GL, Nargund VB, Basavesha KN, Vanarchi R, Kurjogi M, Mulla SI, Tubaki S, Patil RR. (2019). Synthesis of Gossypium hirsutum derived silver nanoparticles and their antibacterial efficacy against plant pathogens. *Appl Organomet Chem* 33:e4630. <https://doi.org/10.1002/aoc.4630>
- Wang Z, Hassan MU, Nadeem F, Wu L, Zhang F, Li X. (2020). Magnesium fertilization improves crop yield in most production systems: a meta-analysis. *Frontiers in Plant Science* 10:1727. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01727>
- Wang, J., Zhao, S., Li, Z., Chai, J., Feng, J., & Han, R. (2023). Phytotoxicity and the molecular response in yttrium oxide nanoparticle–treated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Protoplasma*, 260(3): 955-966.
- Wang, L., & Muhammed, M. (1999). Synthesis of zinc oxide nanoparticles with controlled morphology. *Journal of Materials Chemistry*, 9(11): 2871-2878.

- Wang, X., Xie, H., Wang, P., & Yin, H. (2023). Nanoparticles in plants: uptake, transport and physiological activity in leaf and root. *Materials*, 16(8): 3097. <https://doi.org/10.3390/ma16083097>
- Wang, Z., Xie, X., Zhao, J., Liu, X., Feng, W., White, J.C. y Xing, B. (2012). Xylem and phloembased transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental science y technology*, 46(8): 4434-4441. <https://doi.org/10.1021/es204212z>
- Wu, H., Tito, N., & Giraldo, J. P. (2017). Anionic cerium oxide nanoparticles protect plant photosynthesis from abiotic stress by scavenging reactive oxygen species. *ACS nano*, 11(11): 11283-11297. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b05723>
- Wu, Z., Bañuelos, GS, Lin, ZQ, Liu, Y., Yuan, L., Yin, X. & Li, M. (2015). Biofortificación y fitorremediación de selenio en China. *Frontiers in Plant Science*, 6: 136. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00136>
- Yan, S., Wu, F., Zhou, S., Yang, J., Tang, X., & Ye, W. (2021). Zinc oxide nanoparticles alleviate the arsenic toxicity and decrease the accumulation of arsenic in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC plant biology*, 21: 1-11.
- Yang F, Liu C, Gao F, Su M, Wu X, Zheng L, Hong F, Yang P (2007). The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO₂treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biological Trace Element Research* 119:77– 88. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-0046-4>
- Ye, Y., Cota-Ruiz, K., Hernandez-Viezcas, J. A., Valdes, C., Medina-Velo, I. A., & Turley, R. S. (2020). Manganese nanoparticles control salinity-modulated molecular responses in *Capsicum annuum* L. through priming: a sustainable approach for agriculture. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering Journal*. 8: 1427–1436. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05615>
- Zhang, J., Sun, Yin, Su, H., Liao, & Yan. (2002). Control of ZnO morphology via a simple solution route. *Chemistry of Materials*, 14(10): 4172-4177. <https://doi.org/10.1021/cm020077h>
- Zhang, L., Zhang, Q., Jiang, Y., Li, Y., Zhang, H., & Li, R. (2018). Reference genes identification for normalization of qPCR under multiple stresses in *Hordeum brevisubulatum*. *Plant Methods*, 14(1): 110. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0379-3>

- Zhao, L., Sun, Y., Hernandez-Viezcas, J. A., Servin, A. D., Hong, J., Niu, G., ... & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(49): 11945-11951. <https://doi.org/10.1021/jf404328e>
- Zhou, W., Wang, S., Yang, L., Sun, Y., Zhang, Q., Li, B., & Wang, Z. (2019). Reference genes for qRT-PCR normalisation in different tissues, developmental stages, and stress conditions of *Hypericum perforatum*. *PeerJ*, 7: e7133. <https://doi.org/10.7717/peerj.7133>
- Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A., & Munné-Bosch, S. (2019). Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations. *Plant Science*, 289: 110270. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110270>

**CAPÍTULO 2. SÍNTESIS QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE ZINC Y SU EVALUACIÓN EN PLÁNTULAS DE *Lactuca sativa***

2.1 Resumen

En la actualidad existen investigaciones sobre los diferentes efectos de nanomateriales en la agricultura para mejorar la germinación y la productividad de los cultivos, con la finalidad de garantizar la sostenibilidad económica y el uso eficiente de los recursos de producción en la agricultura. Las nanopartículas de ZnO aplicadas en este estudio fueron sintetizadas por un método de precipitación química y su caracterización se realizó por (DRX), (MEB), espectroscopía UV- visible y (FTIR). Se determinó el efecto sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) por medio de un diseño completamente al azar con cinco tratamientos de NPs-ZnO y un tratamiento control cada uno con cuatro repeticiones. Se midieron índices fisiológicos, se cuantificó el contenido de clorofila y carotenoides, y el contenido de compuestos fenólicos en las plántulas de lechuga. Los resultados indican que aplicando dosis de 50 mg L⁻¹ NPs-ZnO, se lograron mayores valores del porcentaje de germinación (36.97%), peso fresco de plúmula (23.91%), peso fresco de radícula (63.25%) y longitud de radícula (50.58%) respecto a los grupos control. Asimismo, se incrementó el contenido de fenoles totales (207.9%). Dosis superiores a 125 mg L⁻¹ NPs-ZnO disminuyen el contenido de clorofila, causando efectos fitotóxicos en las plántulas de *L. sativa*. En cuanto al contenido de carotenoides el mejor tratamiento fue de 100 mg L⁻¹ NPs-ZnO. El uso de NPs-ZnO sintetizadas a través de un método de precipitación química es una buena alternativa para ser utilizadas como inductores en la biosíntesis de compuestos bioactivos en plántulas de lechuga.

Palabras clave: *Lactuca sativa*, nanotecnología, toxicidad.

2.2 Abstract

There are currently studies on the different effects of nanomaterials in agriculture to improve crop germination and productivity, in order to ensure economic sustainability and the efficient use of production resources in agriculture. The ZnO nanoparticles applied in this study were synthesized by a chemical precipitation method and their characterization was performed by XRD, SEM, UV-visible spectroscopy and FTIR. The effect on the germination of lettuce (*Lactuca sativa*) seeds was determined by means of a completely randomized design with five ZnO-NPs treatments and a control treatment each with four repetitions. Physiological indices were measured, chlorophyll and carotenoid contents, and phenolic compound content in lettuce seedlings were quantified. The results indicate that applying doses of 50 mg L⁻¹ ZnO-NPs, higher values of germination percentage (36.97%), fresh weight of plumule (23.91%), fresh weight of radicle (63.25%) and radicle length (50.58%) were achieved compared to the control groups. Likewise, the total phenol content increased (207.9%). Doses greater than 125 mg L⁻¹ ZnO-NPs decrease the chlorophyll content, causing phytotoxic effects on *L. sativa* seedlings. As for the carotenoid content, the best treatment was 100 mg L⁻¹ ZnO-NPs. The use of ZnO-NPs synthesized through a chemical precipitation method is a good alternative to be used as inducers in the biosynthesis of bioactive compounds in lettuce seedlings.

Keywords: *Lactuca sativa*, nanotechnology, toxicity.

2.3 Introducción

La nanotecnología ha ganado una gran atención con el tiempo y promueve la aplicación de nanopartículas en una amplia gama de campos de la industria agrícola. Las nanopartículas (NPs) tienen un tamaño promedio <100 nm y se componen de carbono, metal, óxidos metálicos o materia orgánica (Hasan, 2015). Se pueden sintetizar por métodos, como el método sol-gel, deposición química de vapor, precipitación, descomposición térmica o síntesis hidrotermal (Salama *et al.*, 2019). El tamaño de estos materiales permite que manifiesten propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del mismo material con tamaños de partícula mayores, debido principalmente a dos razones: las nanopartículas poseen mayor superficie específica por unidad de volumen y por tanto mayor reactividad (Ealia & Saravanakumar, 2017). Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) por sus propiedades opto-eléctricas, físicas y antimicrobianas presentan efectos positivos en las plantas (Faizan *et al.*, 2020). Varios estudios sugieren que las NPs-ZnO tienen la capacidad de mejorar el crecimiento en diferentes especies de plantas. En la germinación de semillas aumenta con la aplicación de NPs-ZnO en concentraciones bajas; sin embargo, en concentraciones altas sucede un efecto negativo en la germinación (Raskar & Laware, 2014; Afrayeem & Chaurasia, 2017). Por ejemplo, Lin & Xing. (2007) encontraron que la aplicación de dosis altas de NPs-ZnO $>2\ 000$ mg L⁻¹ inhibían la germinación de semillas de *Lolium perenne*. Dhoke *et al.* (2013) observó que las NPs-ZnO, como fertilizante de micronutrientes, mejoraron el crecimiento de plántulas de *Vigna radiata* y *Cicer arietinum* a concentraciones bajas en rangos de 1-20 mg L⁻¹.

La lechuga (*Lactuca sativa*) pertenece a la familia de las Asteráceas, y es uno de los principales cultivos del mundo considerada como la verdura de hoja más importante y conocida como la verdura fresca cortada más común (Abdalla *et al.*, 2021). Con base a lo anteriormente descrito, el objetivo de este estudio fue sintetizar y caracterizar nanopartículas de ZnO por un método convencional de precipitación química controlada, así mismo, evaluar el efecto de estas nanopartículas en la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Localización del experimento

El presente estudio fue desarrollado en la Universidad Politécnica de la Región Laguna, México. Localizada a una latitud 25° 46' 59.8" latitud norte, 103° 11' 30.1" longitud oeste.

2.4.2 Síntesis de nanopartículas de ZnO

Se sintetizaron mediante una modificación del método descrito por Aquino et al. (2018). Se utilizó acetato de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ como precursor y la producción de nanopartículas consistió en una precipitación controlada con NaOH. Se disolvió NaOH 0.1 M en 250 mL bajo agitación constante y a una temperatura de 70 °C en una parrilla de calentamiento con agitación magnética Labnet. Luego de obtener la temperatura deseada se añadieron 25 mL de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0.5 M gota por gota con calentamiento y se continuó agitando durante 2 h. Se obtuvo una solución de color blanco. Este compuesto se filtró y se lavó varias veces con agua desionizada para eliminar cualquier impureza. Se secó en una estufa a una temperatura de 70 °C durante 24 h. La muestra se llevó a calcinación a una temperatura de 500 °C por 3 h en una mufla Novatech MD-12-ESP. El polvo blanco resultante se trituro con un mortero para obtener NPs-ZnO.

2.4.3 Caracterización de nanopartículas de ZnO

Las NPs-ZnO sintetizadas se caracterizaron por medio de diversas técnicas analíticas que incluyen difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía UV-visible y espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR). El análisis DRX se llevó a cabo en un difractómetro de rayos-X PANalytical, Empyrean con radiación $\text{K}\alpha$ de cobre con longitud de onda $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ con el propósito de conocer la pureza de la muestra. El goniómetro se operó desde 5° hasta 90° en 2θ y la velocidad de barrido fue de 30 s con un paso de 0.026°. Las fases presentes se identificaron mediante las cartas de difracción ICSD (Inorganic Crystal Structure DataBase) y el software HighScore Plus.

Las imágenes para la determinación de la morfología superficial se realizaron con un microscopio electrónico de barrido TESCAN MIRA con emisión de campo FEG, la muestra se recubrió con oro-paladio mediante sputtering. Las propiedades ópticas de la muestra se estudiaron con un espectrofotómetro UV-visible Jenway 7305 utilizando agua como disolvente de referencia. El espectro FTIR se registró con un aparato Nicolet IR 100 Thermo Scientific en un intervalo de 4 000-400 cm^{-1} usando la técnica de pastilla en KBr.

2.4.4 Prueba de germinación de semillas

Las pruebas se realizaron utilizando semillas de lechuga roja sangría (*Lactuca sativa*) de la compañía Rancho Los Molinos. Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 75% durante 5 min y se lavaron con agua desionizada (Li *et al.*, 2019). Las pruebas de germinación se realizaron colocando 10 semillas por cada placa Petri de 90 mm de diámetro las cuales contenían papel filtro humedecido con 5 mL de cada solución preparada de NPs-ZnO.

Los tratamientos fueron divididos en: (control) agua desionizada, 25, 50, 75, 100 y 125 mg L^{-1} de NPs-ZnO para probar cómo diferentes concentraciones pueden afectar la viabilidad de la semilla. Se prepararon cuatro réplicas por cada muestra respectivamente. Las placas Petri se sellaron con papel Parafilm y se colocaron en una cámara de crecimiento artificial Novatech CA-550 a 25 ± 2 °C con un ciclo día/noche de 12 h por un periodo de siete días (Liu *et al.*, 2016).

2.4.5 Medición de índices fisiológicos

Se realizó la medición de índices fisiológicos que incluye el vigor de semillas (%), el porcentaje de germinación (%), la longitud de la radícula (mm), peso fresco de plúmula y radícula (mg) (Li *et al.*, 2019). El peso fresco de la plúmula y la radícula se pesaron en una balanza analítica AND HR- 250AZ y se reportó en miligramos por plúmula.

Porcentaje de germinación. Después de siete días, se registró el número total de semillas germinadas, y el resultado se expresó como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{(\text{número de semillas germinadas})}{(\text{número de semillas incubadas})} \times 100$$

Vigor de semillas. Al cuarto día después de la siembra, se realizó el primer conteo para la toma de datos de semillas germinadas (plántulas que tienen bien desarrolladas la radícula y la plúmula, con desarrollo total de 2 cm en promedio) (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2021). Para determinar el vigor de la semilla, expresando el resultado en porcentaje según la ecuación:

$$\text{Vigor de semilla} = \frac{(\text{plántulas normales})}{(\text{número de semillas incubadas})} \times 100$$

2.4.6 Determinación del contenido de clorofila (Chl) y carotenoides

Se determinó clorofila a (Chl_a) y b (Chl_b) y carotenoides (Car) después de la aparición de 3 a 4 hojas verdaderas a los 20 días del desarrollo de las plántulas por el método de Lichtenthaler & Wellburn (1983) suspendiendo 0.5 g de muestra fresca en 10 mL alcohol etílico al 95%. El homogeneizado se centrifugó a 1500 ×g durante 20 min y se recogió el sobrenadante. Luego se registraron las lecturas de absorbancia a 665, 649 y 470 nm en un espectrofotómetro UV-visible Jenway 7305. El contenido se reportó según las ecuaciones (Lichtenthaler & Wellburn, 1983):

$$\text{Chl}_a = 13.95 A_{665} - 6.88 A_{649}$$

$$\text{Chl}_b = 24.96 A_{649} - 7.32 A_{665}$$

$$\text{Car} = (1\,000 A_{470} - 2.05 \text{Chl}_a - 114.8 \text{Chl}_b) / 245$$

2.4.7 Contenido total de fenoles

Se mezclaron 2 g de muestra fresca (hojas verdaderas) en 10 mL de etanol al 80%, y se dejaron en agitación constante por 24 h a 70 rpm y 5 °C. El extracto fue centrifugado a 3 000 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue extraído para los análisis (Salas-Pérez *et al.*, 2016). Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Los

resultados se reportaron en mg de ácido gálico equivalente por 100 g de peso fresco (mg equiv AG 100 g⁻¹ PF).

2.4.8 Análisis estadístico

El experimento se realizó mediante un diseño completamente al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones. La normalidad y la homogeneidad varianzas de los datos para cada variable de respuesta se verificó con la prueba de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico Statistical Analysis System Institute (SAS) versión 9.4. Las variables que se reportan en porcentaje (vigor y germinación) se normalizaron aplicando la transformación de arcoseno y raíz cuadrada.

2.5 Resultados y discusión

2.5.1 Síntesis de nanopartículas de ZnO

La síntesis de las NPs-ZnO se llevó a cabo siguiendo el mecanismo de precipitación. El $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ puede convertirse en $\text{Zn}(\text{OH})_2$ coloidal bajo una solución alcalina ($\text{pH}=13-14$). Durante el proceso hidrotermal, parte del $\text{Zn}(\text{OH})_2$ coloidal se disocia a Zn^{2+} y OH^- . Cuando la concentración de Zn^{2+} y OH^- alcanzan el grado de súper saturación, se forman núcleos de ZnO (Aquino *et al.*, 2018). La calcinación a 500°C favorece la formación del ZnO, además de la cristalización y el crecimiento de las nanopartículas.

2.5.2 Caracterización de nanopartículas de ZnO

De acuerdo con el difractograma obtenido mediante difracción de rayos X (Figura 2.1a) no se detectaron impurezas en este patrón, la muestra contiene solo óxido de zinc en su fase zincita, cuya estructura es hexagonal (ICSD, 98-005-7478), lo que implica que se obtuvieron NPs-ZnO puras. Las micrografías MEB de las NPs-ZnO (Figura 2.1b) se exhibieron de manera muy uniforme presentando una morfología semiesférica y poligonal compatible con la naturaleza cristalina del ZnO, cuyo tamaño oscila entre 67.37 y 71.1 nm. Las propiedades ópticas de las NPs-ZnO estudiadas por espectroscopia UV-visible (Figura 2.1c) muestran un pico de absorción centrado en 378 nm, característico de la estructura hexagonal de ZnO. Las NPs-ZnO sintetizadas sometidas a FTIR (Figura 2.1d) indican los picos característicos del grupo funcional presente, se infiere que la primera banda se observa a partir de 400 a 500 cm^{-1} debido a las vibraciones del enlace Zn-O.

2.5.3 Efecto de las NPs-ZnO en la germinación de semillas Índices fisiológicos

El Cuadro 2.1 muestra el efecto de la exposición de NPs-ZnO en la germinación de las semillas de *L. sativa*. La aplicación de NPs-ZnO tuvo efectos significativos entre los tratamientos y el control ($p \leq 0.05$). En el parámetro de vigor, podemos observar que se obtuvieron resultados positivos al aplicar concentraciones de 25 mg L^{-1} . Mientras que al aplicar 50 mg L^{-1} se mostró una disminución del 9.32% respecto al control, esta pequeña reducción se puede considerar

como un efecto inhibitor del crecimiento relacionado con un elevado potencial osmótico por las dosis de NPs (Hojjat *et al.*, 2017; Tovar-Jimenez *et al.*, 2020). En el porcentaje de germinación, los tratamientos aumentaron respecto al control, a excepción del tratamiento de 125 mg L⁻¹ el cual no mostró diferencia significativa. El mejor tratamiento fue el de 50 mg L⁻¹ incrementando hasta 36.97%. En cuanto al peso fresco de la plúmula y el peso fresco de radícula incremento significativamente en comparación con los otros tratamientos/grupo control, con la dosis de 50 mg L⁻¹.

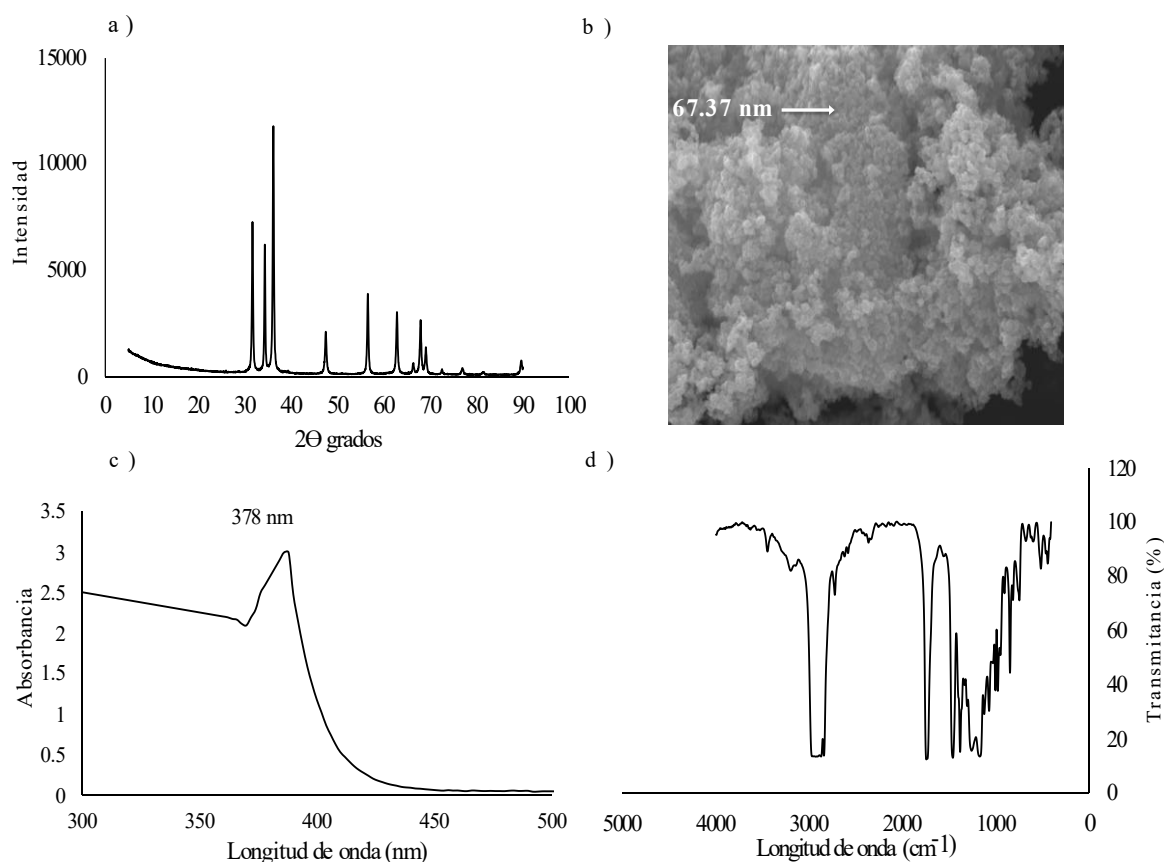


Figura 2.1. Caracterización de NPs-ZnO, a) difractograma de rayos X; b) imagen SEM; c) espectro UV-visible; y d) espectro FTIR.

Cuadro 2.1. Comparación de medias en la germinación, vigor, peso fresco de plúmula, raíz y la longitud de la raíz cuando se aplican NPs-ZnO.

Tratamiento	Vigor	Germinación	Peso fresco de plúmula	Peso fresco de raíz	Longitud de raíz
NPs-ZnO (mg L ⁻¹)	(%)	(%)	(mg)	(mg)	(mm)
Control	46.44 ±2.88 cd	50.76 ±0 c	9.20 ±0.38 cd	1.66 ±0.29 c	21.25 ±0.50 d
25	60.11 ±3.83 a	60.11 ±3.83 b	8.32 ±0.30 d	1.16 ±0.06 d	25.50 ±1.0 b
50	42.11 ±3.33 d	69.53 ±4.06 a	11.40 ±0.56 a	2.71 ±0.09 a	32.0 ±0.81 a
75	52.27 ±3.01 bc	65.46 ±4.06 ab	9.78 ±0.14 bc	2.10 ±0.11 b	25.0 ±0.81 b
100	53.77 ±3.47 ab	65.46 ±4.06 ab	9.79 ±0.52 bc	1.23 ±0.15 d	23.25 ±0.50 c
125	46.44 ±2.88 cd	50.76 ±0 c	10.22 ±0.40 b	1.29 ±0.27 cd	10.25 ±0.50 e

*Valores con letras distintas dentro de una misma columna, indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores son el promedio de cuatro repeticiones. Medias (n= 24) ± desviación estándar.

Dicho efecto podría atribuirse con un aumento en el nivel de Zn dentro de las semillas de lechuga y su interacción en los procesos bioquímicos (Rawashdeh *et al.*, 2020). En la longitud de la radícula también hubo diferencia significativa y el mejor tratamiento fue el de 50 mg L⁻¹ respecto a los tratamientos/grupo control. Sin embargo, debido a la forma, el tamaño, la carga superficial, la composición química y la concentración de las nanopartículas pueden provocar diferentes impactos en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas (Szöllősi *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en este estudio señalan que el mejor tratamiento de aplicación de NPs-ZnO fue de 50 mg L⁻¹, comparado con otros autores que señalan una respuesta positiva al aplicar 25 mg L⁻¹ NPs-ZnO sobre la germinación y la biomasa en semillas de *L. sativa* reportado por Rawashdeh *et al.* (2020). Las semillas de lechuga embebidas en NPs pueden mostrar un crecimiento acelerado en comparación con las semillas de control no tratadas. Una vez que los iones están dentro de las semillas, modulan la síntesis y el metabolismo de proteínas, el contenido de carbohidratos y mayor actividad de enzimas antioxidantes (Rawashdeh *et al.*, 2020).

2.5.4 Clorofila y carotenoides

Se cuantificó el contenido de clorofilas incluyendo Chla y Chlb de las plántulas tratadas con NPs-ZnO como se muestra en la Figura 2.2a. El análisis estadístico de los resultados de la variable de Chla del presente trabajo no mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 mg L^{-1} de las NPs-ZnO aplicadas; sin embargo, se observa un cambio con 125 mg L^{-1} NPs-ZnO que redujó hasta 40.49% Chla respecto al control. Además, la aplicación de NPs-ZnO cambió significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido de Chlb, las comparaciones de medias mostraron que la Chlb más alta se encontró en el tratamiento de 50 mg L^{-1} NPs-ZnO, incluso las concentraciones de 25 y 75 mg L^{-1} NPs-ZnO superaron al control. Sin embargo, a 100 y 125 mg L^{-1} NPs-ZnO disminuyó el contenido de Chlb en las plántulas alrededor de 31.25% y 37.5%, respectivamente.

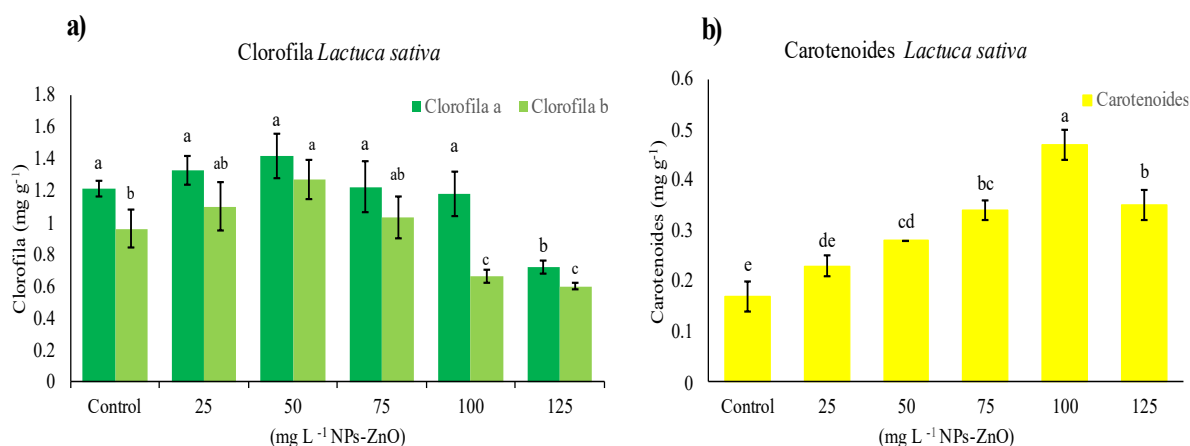


Figura 2.2. Contenido de clorofila a (verde oscuro) y b (verde claro) (a) Contenido de carotenos (b) de *L. sativa* después de cada tratamiento. Los datos se muestran como medias ($n= 24$) $\pm$ desviación estándar. Valores con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El Zn es un elemento pesado y, al igual que otros metales pesados, en grandes cantidades es tóxico para muchas plantas, y la degradación de la clorofila en estas circunstancias es evidente (Mohsenzadeh & Moosavian, 2017). Estos resultados demuestran que las NPs-ZnO a altas concentraciones disminuyen drásticamente el contenido de clorofila, parece que tal vez la reducción en la cantidad de clorofila se deba a la prevención o degradación de los precursores

de estos pigmentos. El contenido de clorofila se considera un índice importante de la cantidad total de complejo captador de luz y los componentes de transporte de electrones, se relaciona positivamente con la tasa fotosintética (Li *et al.*, 2019), por lo que puede usarse como un indicador para medir el grado de estrés causado por las NPs (Yan *et al.*, 2021). La fotosíntesis de los cloroplastos se altera, lo que hace que el oxígeno se convierta en un aceptor de electrones y se produzcan especies reactivas de oxígeno (Yan *et al.*, 2021). Por otra parte, el tratamiento con NPs-ZnO incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido de carotenoides en las plántulas de *L. sativa* (Figura 2.2b). El contenido de carotenoides más alto se encontró en la concentración de 100 mg L⁻¹ NPs-ZnO, con un aumento de hasta 176.4% respecto al control. Los carotenoides están presentes en los plastos de los tejidos vegetales y en el estrés ambiental desencadenan el estrés oxidativo, son los encargados de proteger los tejidos fotosintéticos, especialmente la clorofila. Según los resultados obtenidos en este estudio, parece que cierta cantidad de zinc induce estrés oxidativo y provoca la síntesis de carotenoides (Mohsenzadeh & Moosavian, 2017). Lo que sugiere que la reducción en la fotosíntesis es causada por la reducción del contenido de clorofilas. Los resultados corroboran los hallazgos encontrados por Wang *et al.* (2016) de la exposición de NPs-ZnO en la acumulación de biomasa y la fotosíntesis en *Arabidopsis*.

2.5.5 Fenoles

En este estudio, la aplicación de concentraciones de 75 y 125 mg L⁻¹ NPs-ZnO no mostraron diferencia significativa en el contenido de fenoles totales de las plántulas de *L. sativa*. Mientras que la aplicación de 25, 50 y 100 mg L⁻¹ NPs-ZnO incrementaron significativamente respecto al tratamiento control ($p \leq 0.05$) (Figura 2.3). El papel del zinc en el uso del carbono para producir compuestos fenólicos en el ciclo del ácido shikímico y el acetato puede ser una de las razones de este aumento (Misra *et al.*, 2006). El zinc induce el estrés oxidativo y conducirá a la producción de radicales libres en la planta, la planta conducirá al estrés y superará a estas especies.

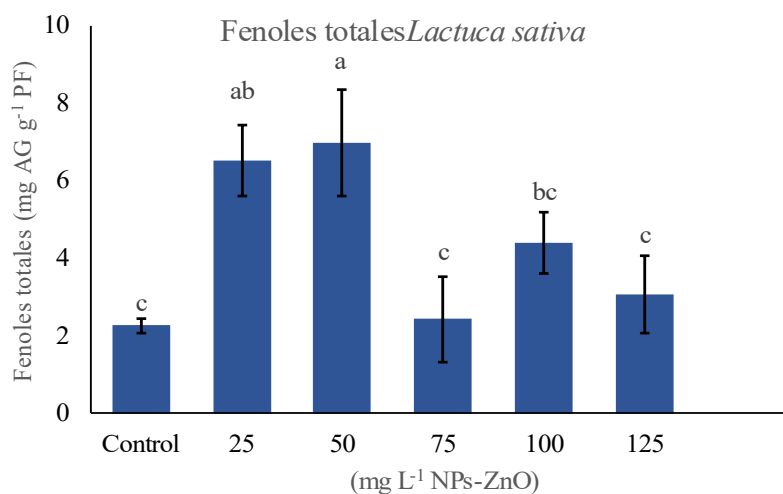


Figura 2.3. Contenido de compuestos fenólicos totales de *L. sativa* después de cada tratamiento. Los datos se muestran como medias ($n = 24$) $\pm$ desviación estándar. Valores con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En respuesta a este estrés, las plantas liberan varios compuestos defensivos conocidos como metabolitos secundarios antioxidantes incluyendo diferentes grupos de polifenoles (Paramo *et al.*, 2020). Así, mejora este parámetro relacionado con el sistema antioxidante de las plántulas, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Faizan *et al.*, 2018; Paramo *et al.*, 2020; Ramírez Rodríguez *et al.*, 2021).

2.6 Conclusiones

La caracterización realizada demostró que la síntesis de NPs-ZnO mediante un proceso químico permitió obtener tamaños de partícula de 67.31-71.1 nm. Este estudio analizó soluciones de NPs-ZnO en un rango de concentraciones de 25 a 125 mg L⁻¹ en plántulas de lechuga y proporciona datos valiosos y evidencia para aumentar la productividad de cultivos al aumentar la concentración de compuestos útiles, como antioxidantes y metabolitos secundarios. Las NPs-ZnO podrían ser una buena alternativa para mejorar la calidad de las plántulas; sin embargo, se necesita más investigación para aclarar los efectos de los NPs-ZnO ya que existen factores que dependen de la especie y la concentración.

2.7 Literatura citada

- Abdalla, M. A., Li, F., Wenzel-Storjohann, A., Sulieman, S., Tasdemir, D. & Mühling, K. H. (2021). Comparative metabolite profile, biological activity, and overall quality of three lettuce (*Lactuca sativa* L., Asteraceae) cultivars in response to sulfur nutrition. *Pharmaceutics*. 5(13):713. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050713>.
- Afrayeem, S. M., & Chaurasia, A. K. (2017). Effect of zinc oxide nanoparticles on seed germination and seed vigour in chilli (*Capsicum annum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(5):1564-1566.
- Aquino, P., Osorio, A. M., Ninán, E. & Torres, F. (2018). Caracterización de nanopartículas de ZnO sintetizadas por el método de precipitación y su evaluación en la incorporación en pinturas esmalte. *Rev. de la Sociedad Química del Perú*. 84(1):5-17.
- Dhoke, S. K., Mahajan, P., Kamble, R. & Khanna, A. (2013). Effect of nanoparticles suspension on the growth of mung (*Vigna radiata*) seedlings by foliar spray method. *Nanotechnology Development*. 3(1):e1-e1. <https://doi.org/10.4081/nd.2013.e1>.
- Dziki, D., Gawlik-Dziki, U., Kordowska-Wiater, M. & Domań-Pytka, M. (2015). Influence of elicitation and germination conditions on biological activity of wheat sprouts. *Journal of Chemistry*. 2015:1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/649709>.
- Ealia, A. M. & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterization, synthesis of nanoparticles and their application. In *IOP Conference series: materials science and engineering*. 263(3):032019 <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>.
- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S. T. & Hayat, S. (2018). Zinc oxide nanoparticle- mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*. 56(2):678-686. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0717-0>.
- Faizan, M., Hayat, S. & Pichtel, J. (2020). Effects of zinc oxide nanoparticles on crop plants: a perspective analysis. *Sustainable Agriculture Reviews*. (41):83-99. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8-4>.

- Hasan, S. (2015). A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences*. 4 (ISC- 2014):9-11.
- Hojjat, S. S. & Kamyab, M. (2017). The effect of silver nanoparticle on Fenugreek seed germination under salinity levels. *Russian Agricultural Sciences* 43(1):61-65. <https://doi.org/10.3103/S1068367417010189>.
- Li, R., He, J., Xie, H., Wang, W., Bose, S. K., Sun, Y., Hu, J. & Yin, H. (2019). Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Biological Macromolecules* 126:91-100. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.118>.
- Lichtenthaler, H. K. & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 11(5):591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>.
- Lin, D. & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 150(2):243-250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>.
- Liu, R., Zhang, H. & Lal, R. (2016). Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients? *Water Air and Soil Pollution*. 227(1):1-14. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2738-2>.
- Misra, A., Dwivedi, S., Srivastava, A. K., Tewari, D. K., Khan, A. & Kumar, R. (2006). Low iron stress nutrition for evaluation of Fe-efficient genotype physiology, photosynthesis, and essential monoterpene oil (s) yield of *Ocimum sanctum*. *Photosynthetica*. 44(3):474-477. <https://doi.org/10.1007/s11099-006-0054-1>.
- Mohsenzadeh, S. & Moosavian, S. S. (2017). Zinc sulphate and nano-zinc oxide effects on some physiological parameters of *Rosmarinus officinalis*. *American Journal of Plant Science* 8(11):2635-2649. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.811178>.

- Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S. & Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in agroindustry: applications, toxicity, challenges, and trends. *Nanomaterials*. 10(9):1-19. <https://doi.org/10.3390/nano10091654>.
- Ramírez-Rodríguez, S. C., Ortega-Ortiz, H., Fortis-Hernández, M., Nava-Santos, J. M., Orozco- Vidal, J. A. & Preciado-Rangel, P. (2021). Nanopartículas de quitosano mejoran la calidad nutracéutica de germinados de triticale. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(4):579-589. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2929>.
- Raskar, S. V. & Laware, S. L. (2014). Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3(2):467-473.
- Rawashdeh, R. Y., Harb, A. M. & AlHasan, A. M. (2020). Biological interaction of zinc oxide nanoparticles; lettuce seed as case of study. *Heliyon*. 6(5):e03983. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03983>.
- Salama, D. M., Osman, S. A., Abd El-Aziz, M. E., Abd-Elwahed, M. S. A. & Shaaban, E. A. (2019). Effect of zinc oxide nanoparticles on the growth, genomic DNA, production and the quality of common dry bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. (18):101083. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101083>.
- Salas-Pérez, L., Gaucín-Delgado, J. M., Preciado-Rangel, P., Fortis-Hernández, M., Valenzuela-García, J. R. & Ayala-Garay, A. V. (2016). Efecto del ácido benzoico en la capacidad antioxidante de germinados de trigo. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 3(17):3397-3404.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299(7):152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Szöllősi, R., Molnár, Á., Kondak, S. & Kolbert, Z. (2020). Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: Stimulation vs phytotoxicity. *Plants*. 9(12):1745. <https://doi.org/10.3390/plants9121745>.

- Tovar-Jimenez, G. I., Flores, S., Suarez, J., González, G. & Briceño, S. (2020). Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles using *Moringa oleifera* and chitosan and its evaluation on corn germination. *Environmental Nanotechnology, Monitoring Management*. (14):100350. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100350>.
- Wang, X., Yang, X., Chen, S., Li, Q., Wang, W., Hou, C., Gao, X., Wang, L. & Wang, S. (2016). Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. (6):1243. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>.
- Yan, S., Wu, F., Zhou, S., Yang, J., Tang, X. & Ye, W. (2021). Zinc oxide nanoparticles alleviate the arsenic toxicity and decrease the accumulation of arsenic in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*. 21(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02929-3>.

CAPÍTULO 3. NANOPARTÍCULAS DE ZnO, SINTETIZADAS POR PRECIPITACIÓN QUÍMICA, PARA INCREMENTAR LA GERMINACIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN GERMINADOS DE *Raphanus sativus*

3.1 Resumen

Objetivo: Examinar la influencia de cebado con nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) en la germinación, pigmentos fotosintéticos, compuestos fenólicos y contenido de zinc de germinados de rábano.

Diseño/metodología/aproximación: Se evaluaron un total de cinco tratamientos de NPs-ZnO y un tratamiento control cada uno con cuatro repeticiones bajo un diseño completamente al azar.

Resultados: Las NPs-ZnO evaluadas aumentaron las variables de germinación, los pigmentos fotosintéticos, compuestos fenólicos y contenido de zinc en comparación con los germinados de rábano no tratados.

Limitaciones del estudio/implicaciones: Es difícil establecer un modelo de respuesta de los efectos de las NPs debido a que la forma, el tamaño, la carga superficial, la composición química y la concentración de las NPs pueden provocar diferentes impactos en la germinación de semillas.

Hallazgos/conclusiones: El uso de NPs-ZnO podría ser una manera eficaz de enriquecer a los cultivos, ya que al trasladar Zn por tejidos vegetales se provocará una acumulación de este micronutriente.

Palabras clave: *Raphanus sativus*, nanofertilizante, óxido de zinc.

3.2 Abstract

Objective: To examine the influence of priming with zinc oxide nanoparticles (NPs-ZnO) on germination, photosynthetic pigments, phenolic compounds and zinc content of radish sprouts.

Design/methodology/approach: A total of five NPs-ZnO treatments and one control treatment each with four replications under a completely randomized design were evaluated.

Results: The NPs-ZnO evaluated increased the variables of germination, photosynthetic pigments, phenolic compounds and zinc content compared to untreated radish sprouts.

Limitations on study/implications: It is difficult to establish a response model of the effects of NPs because the shape, size, surface charge, chemical composition and concentration of NPs can cause different impacts on seed germination.

Findings/conclusions: The use of NPs-ZnO could be an effective way to enrich crops, since moving Zn through plant tissues will cause an accumulation of this micronutrient.

Keywords: *Raphanus sativus*, nanofertilizer, zinc oxide.

3.3 Introducción

En vista de la creciente demanda de productos agrícolas, impulsar la producción y productividad de los cultivos es un gran desafío en el mundo. Se requiere de la introducción de tecnologías innovadoras para aumentar la sostenibilidad en la agricultura moderna (Rai-Kalal & Jajoo, 2021). El uso y aplicación de nanopartículas para estimular el crecimiento de las plantas y modular sus respuestas fisiológicas es una práctica relativamente reciente. El nanocebado puede mejorar la germinación de semillas y reducir el envejecimiento (Mahakham *et al.*, 2017), desencadenando procesos metabólicos normalmente activados durante la fase temprana de la germinación y, en consecuencia, mejora la tasa de germinación y emergencia, lo que ayuda a las semillas a mantenerse bajo diferentes estreses abióticos (Singh *et al.*, 2020). Aunado a lo anterior, las nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) han presentado efectos positivos en el crecimiento de frijol mungo, garbanzo, pepino, alfalfa, tomate, etc. (Mahajan *et al.*, 2011; De la Rosa *et al.*, 2013). El rábano (*Raphanus sativus*) es un tubérculo esencial de la familia Brassicaceae, es un cultivo hortícola anual y consumido en todo el mundo debido a su valor nutricional (Xie *et al.*, 2018) y ha demostrado ser un alimento saludable en la dieta y la salud humana. Es una especie que está siendo estudiada profundamente y que se está incorporando como modelo biológico en ciencia para la descripción de los efectos tóxicos que algunas sustancias químicas tienen para la germinación (Taladrid & Espinosa, 2021). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue utilizar NPs-ZnO, sintetizadas por un método convencional de precipitación química controlada, para mejorar la germinación, el crecimiento, los compuestos bioactivos y la concentración de zinc de germinados de rábano.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Nanopartículas de óxido de zinc

Las nanopartículas utilizadas fueron de óxido de zinc (NPs-ZnO), con un tamaño entre 67 y 71 nm, una pureza del 99%, de color blanco y de forma estructural semiesférica y poligonal. Las NPs-ZnO fueron sintetizadas a través de un método químico de precipitación controlada de acuerdo con lo reportado por Galindo-Guzmán *et al.* (2022), utilizando acetato de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ como precursor.

3.4.2 Tratamientos aplicados de NPs-ZnO

Se aplicaron seis tratamientos, los cuales fueron divididos en: control (agua desionizada), 25, 50, 75, 100 y 125 mg L⁻¹ de NPs-ZnO para probar cómo diferentes concentraciones pueden afectar la viabilidad de la semilla.

3.4.3 Germinación de semillas

Se emplearon semillas de rábano variedad Champion (Hortaflo®). Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 75% y se lavaron con agua desionizada. Las pruebas de germinación se realizaron colocando 10 semillas por cada tratamiento en placas Petri de 90 mm de diámetro las cuales contenían papel filtro Whatman. Los tratamientos se aplicaron una sola vez durante la etapa de imbibición, para lo cual se añadieron 5 mL de suspensión de NPs-ZnO con una pipeta, en cada uno de los tratamientos. Se prepararon 4 réplicas por cada muestra. Las placas Petri se sellaron con papel Parafilm y se colocaron en una cámara de crecimiento artificial Novatech CA-550 a 22 ± 2 °C por un periodo de 7 días (Don *et al.*, 2013).

3.4.4 Parámetros evaluados durante el experimento

El ensayo se desarrolló de acuerdo con los lineamientos de la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (ISTA), las cuales consideran los siguientes parámetros: porcentaje de vigor

y de germinación (%), longitud de radícula (cm), acumulación de biomasa de la plúmula y de radícula en miligramos por germinado.

3.4.5 Determinación del contenido de clorofila y carotenoides

Se determinó clorofila y carotenoides por el método de Lichtenthaler & Wellburn (1983). Se registraron las lecturas de absorbancia a 665, 649 y 470 nm en un espectrofotómetro UV-visible Jenway 7305.

3.4.6 Contenido total de fenoles

Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron por el método de Fo-lin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Los resultados se reportaron en mg de ácido gálico equivalente por 100 g de peso fresco (mg equiv AG 100 g⁻¹ PF).

3.4.7 Zinc

El Zn fue cuantificado en un espectrofotómetro de absorción atómica (AA) de generación de hidruros (Lab Wrench Varian SpectrAA®, modelo 220Fast). Los resultados se presentan en µg kg⁻¹ de peso seco.

3.4.8 Análisis estadístico

El experimento se realizó mediante un diseño completamente al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones. La normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos para cada variable de respuesta se verificó con el test de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov (Bartlett, 1937; Steinskog *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico (SAS) versión 9.4. Las variables que se reportan en porcentaje (vigor y germinación) se normalizaron aplicando la transformación de arcoseno y raíz cuadrada (Steel & Torrie, 1960).

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Efecto de NPs-ZnO en el vigor y germinación de las semillas de rábano

Los resultados muestran que las NPs-ZnO no afectaron de forma significativa ($P \leq 0.05$) el vigor de las semillas y fueron similares al control (Cuadro 3.1). En la variable germinación, la mejor dosis fue la de 100 mg L⁻¹, con un promedio de germinación del 90%, siendo superior un 29.42% respecto al control; mientras que en las dosis de 0, 25, 50, 75 y 125 mg L⁻¹ no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), es difícil establecer un modelo de respuesta de los efectos de las NPs debido a que la forma, el tamaño, la carga superficial, la composición química y la concentración de las NPs pueden provocar diferentes impactos en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas (Ahmad *et al.*, 2021). Además, también hay factores moleculares que afectan a la germinación como por ejemplo las quinasas que actúan como “checkpoint” o puntos de control del ADN y los vínculos entre el “stress” genotóxico y el envejecimiento de las semillas (Taladrid & Espinosa, 2021).

3.5.2 Peso fresco de plúmula y radícula

También se observó un aumento en el peso fresco de plúmula y radícula en los germinados preparados con NPs-ZnO. El aumento máximo en el peso fresco de plúmula y en la radícula fue en la dosis de 100 mg L⁻¹, siendo superior en un 15.49% y 20.57%, con respecto al control, respectivamente. Este comportamiento tiene una relación con el aumento en el porcentaje de germinación, lo que finalmente da como resultado un aumento en la producción de biomasa. Este incremento en la biomasa podría deberse al hecho de que los iones Zn presentes en las semillas de NPs-ZnO juegan un papel vital en la biosíntesis de auxina natural (ácido indol-3-acético) en las plantas, lo que en consecuencia activa la división y el agrandamiento celular (Ali & Mahmoud, 2013). Estos resultados concuerdan con investigaciones previas de Rai-Kalal & Jajoo (2021) quienes reportaron que el Zn juega un papel efectivo en el aumento de biomasa en plántulas de trigo.

3.5.3 Longitud de radícula

Las NPs-ZnO si afectaron de forma significativa ($P \leq 0.05$) la longitud de la radícula (Cuadro 3.1). Con la dosis de 25 mg L^{-1} se tuvo una longitud más larga que el control (7.10 cm) con una diferencia numérica de 14.51%. Para la dosis de 50 mg L^{-1} , se obtuvo una longitud de 6.22 cm, estadísticamente igual al control (6.20 cm) con una diferencia numérica del 0.32%. Los tratamientos de 75 y 125 mg L^{-1} fueron estadísticamente iguales. Se observó un aumento con la dosis de 100 mg L^{-1} alcanzando una longitud de raíz de 9.62 cm. Varios estudios han demostrado que la elongación de raíces mejoró en trigo, sorgo dulce y soja cuando se expusieron a NPs-ZnO en comparación con el control (López-Moreno *et al.*, 2010; Elhaj Baddar & Unrine, 2018; Naseeruddin *et al.*, 2018). Las nanopartículas ingresan en los poros de la cubierta de la semilla, lo que provoca una mayor penetración de las moléculas de agua e induce la actividad enzimática generadora de especies reactivas de oxígeno (ROS) que degrada el almidón para mejorar fisiológicamente la germinación de semillas (Mahakham *et al.*, 2017).

Cuadro 3.1. Comparación de medias en la germinación, vigor, peso fresco de plúmula, radícula y la longitud de la radícula de germinados de rábano cuando se aplican NPs-ZnO.

Tratamiento	Vigor	Germinación	PF de plúmula	PF de radícula	Longitud de radícula
NPs-ZnO (mg L^{-1})	----- (%) -----	----- (%) -----	----- (mg) ----	----- (mg) ----	(cm)
0	69.53±4.06 ^{a*}	69.53±4.06 ^b	55.90±2.41 ^{bc}	26.30±0.57 ^b	6.20±0.31 ^c
25	63.80±6.04 ^a	61.77±3.32 ^b	60.98±6.34 ^b	22.86±1.16 ^{cd}	7.10±0.43 ^{bc}
50	69.53±4.06 ^a	69.53±4.06 ^b	47.66±1.53 ^d	23.85±0.57 ^{bc}	6.22±0.22 ^c
75	69.53±4.06 ^a	69.53±4.06 ^b	45.03±1.41 ^d	21.25±0.55 ^d	8.05±0.12 ^b
100	67.50±4.69 ^a	89.99±0.00 ^a	69.18±4.17 ^a	31.71±1.26 ^a	9.65±0.35 ^a
125	67.50±4.69 ^a	69.53±4.06 ^b	48.28±3.21 ^{cd}	20.39±1.91 ^d	7.27±0.83 ^b

*Valores con letras distintas dentro de una misma columna, indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). (±) desviación estándar.

3.5.4 Pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofila tiene una relación positiva con la tasa fotosintética. Por lo tanto, un cambio en el contenido de clorofila total puede usarse como indicador de la salud de la planta. Como se observa en la Figura 3.1a, los germinados tratados con NPs-ZnO mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Al aplicar la dosis de 25 mg L^{-1} se tuvo un incremento del 4.74% de clorofila, respecto al control. El mayor aumento se observó en la dosis de 50 mg L^{-1} con una diferencia en promedio de 32.03%, respecto al control. Las dosis de 75 y 100 mg L^{-1} fueron estadísticamente iguales entre sí. Sin embargo, se observa una disminución con 125 mg L^{-1} ya que se redujo un 13.96% con respecto al control. Los efectos positivos de las NPs-ZnO en el contenido de clorofila se deben quizás al hecho de que el Zn juega un papel vital en la biosíntesis de clorofila al proteger el grupo sulfhidrilo de la molécula de clorofila (Cakmak, 2008). El Zn también participa en el desarrollo de los cloroplastos y funciona en el proceso de reparación del fotosistema II, mediante el reciclaje de la proteína D1 dañada (Hänsch & Mendel, 2009). Por el contrario, Acharya *et al.* (2020), mencionan que el uso de nanopartículas en cebado de semillas causará toxicidad en los germinados a altas concentraciones, pudiéndose observar una disminución en los pigmentos fotosintéticos.

Los carotenoides juegan un papel importante en el mecanismo de fotoprotección de las plantas. La Figura 3.1b, muestra el efecto en el contenido de carotenoides totales después de la exposición de NPs-ZnO en los germinados de rábano. Para las dosis de 0, 25, 50, 75 y 100 mg L^{-1} no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), pero la dosis de 50 mg L^{-1} reportó el mayor contenido ($7.95 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$). Mientras que para la dosis de 125 mg L^{-1} hubo una disminución a comparación a todos los tratamientos.

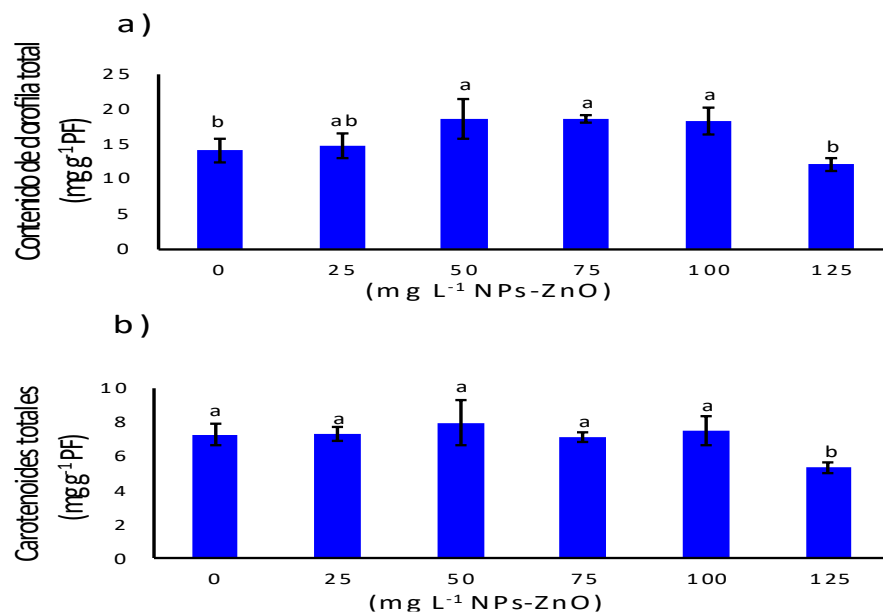


Figura 3.1. Contenido de clorofila (a) Contenido de carotenos (b) en germinados de rábano por efecto de la aplicación de NPs-ZnO. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.5.5 Contenido de fenoles totales

Dosis altas de NPs-ZnO tuvieron un efecto significativo en la síntesis de compuestos fenólicos totales de los germinados (Figura 3.2). Las concentraciones medidas de compuestos fenólicos totales en extractos de rábano estuvieron en el rango de 95.88 a 168.37 de mg AG 100 g⁻¹. El valor más alto se registró después de aplicar 50 mg L⁻¹ NPs-ZnO (168.37 mg AG 100 g⁻¹). Los metabolitos secundarios de naturaleza fenólica son los principales compuestos responsables del mecanismo de defensa de las plantas, pero también de la mejora de los valores nutricionales de los cultivos debido a sus conocidas actividades antioxidantes.

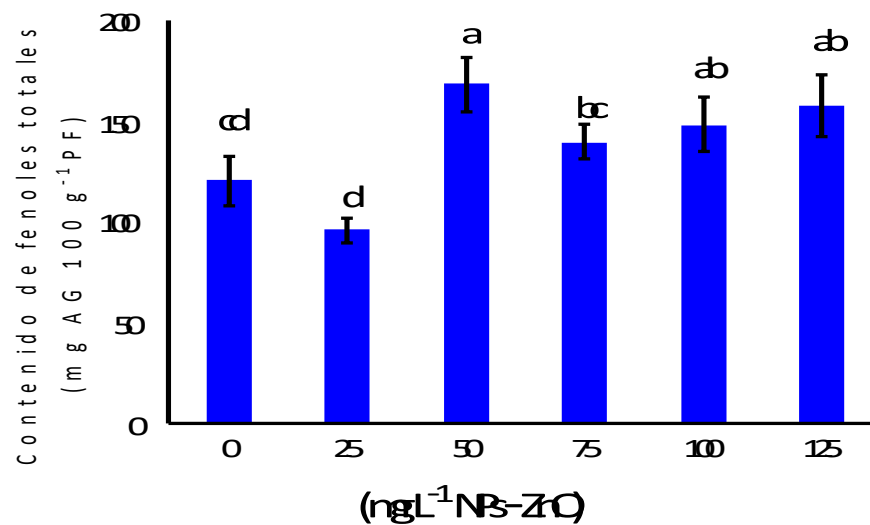


Figura 3.2. Contenido de fenoles totales en germinados de rábano cuando se aplican NPs-ZnO. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.5.6 Zinc

El contenido de Zn en los germinados de rábano se incrementó a medida que aumentaron las dosis aplicadas (Figura 3.3). En el tratamiento control la cantidad de zinc fue de $45.95 \mu\text{g kg}^{-1}$ PS. El mayor contenido de zinc se presentó en la dosis de 125 mg L^{-1} ($82.07 \mu\text{g kg}^{-1}$). Aunque esta concentración sea favorable, se observa que disminuyen los pigmentos fotosintéticos, por lo tanto, utilizar concentraciones más elevadas puede ser perjudicial. De acuerdo con el Instituto de Medicina (2001) la ingesta recomendada de zinc para un adulto se sitúa entre 8 mg día^{-1} para las mujeres y 11 mg día^{-1} para los hombres. La acumulación de Zn en los germinados podría complementar la ingesta diaria.

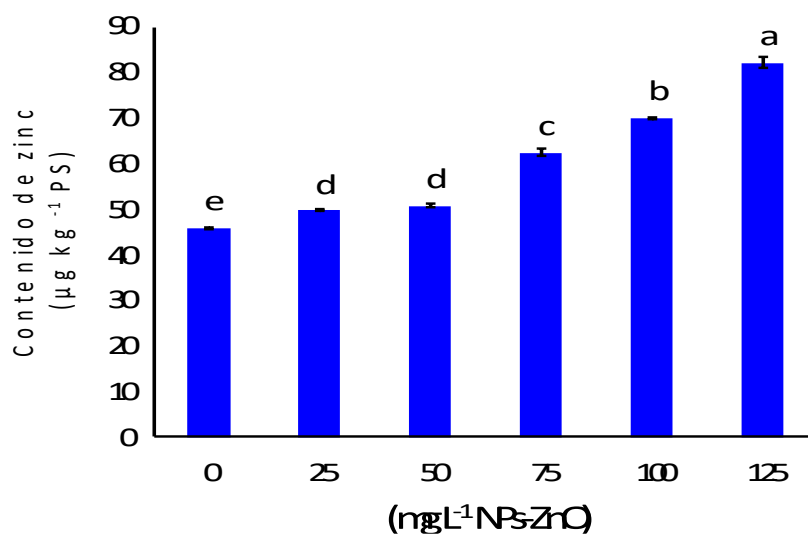


Figura 3.3. Contenido de zinc en germinados de rábano por efecto de la aplicación de NPs-ZnO. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.6 Conclusiones

Las semillas de rábano respondieron positivamente a los tratamientos de NPs-ZnO, mostraron diferente eficacia según las características probadas. En este sentido, el uso de NPs-ZnO podría ser una manera eficaz de enriquecer a los cultivos, ya que al trasladar Zn por tejidos vegetales se provocará una acumulación de este micronutriente.

3.7 Literatura citada

- Acharya, P., Jayaprakasha, G. K., Crosby, K. M., Jifon, J. L., & Patil, B. S. (2020). Nanoparticle-mediated seed priming improves germination, growth, yield, and quality of watermelons (*Citrullus lanatus*) at multi-locations in Texas. *Scientific Reports*, 10(1): 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61696-7>
- Ahmad, A., Hashmi, S. S., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2021). Influence of metallic, metallic oxide, and organic nanoparticles on plant physiology. *Chemosphere*, 133329. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133329>.
- Ali, E., & Mahmoud, A. M. (2013). Effect of foliar spray by different salicylic acid and zinc concentrations on seed yield and yield components of mungbean in sandy soil. *Asian Journal of Crop Science*, 5(1): 33-40. <https://doi.org/10.3923/ajcs.2013.33.40>
- Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences*, 160(901): 268-282. <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? *Plant and soil*, 302(1): 1-17. <https://doi.org/10.1007/S11104-007-9466-3>
- De la Rosa, G., López-Moreno, M. L., de Haro, D., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Effects of ZnO nanoparticles in alfalfa, tomato, and cucumber at the germination stage: root development and X-ray absorption spectroscopy studies. *Pure and Applied Chemistry*, 85(12): 2161-2174. <https://doi.org/10.1351/pac-con-12-09-05>
- Don, R., Kahlert, B., & McLaren, G. (2013). *ISTA Handbook on Seedling Evaluation*. Third Edition with amendments. Bassersdorf: International Seed Testing Association (ISTA), Germination Committee.
- Elhaj Baddar, Z., & Unrine, J. M. (2018). Functionalized-ZnO-nanoparticle seed treatments to enhance growth and Zn content of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(46): 12166-12178. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03277>

- Galindo-Guzmán, A. P., Fortis-Hernández, M., De La Rosa-Reta, C. V., Zermeño-González, H., & Galindo-Guzmán, M. (2022). Síntesis química de nanopartículas de óxido de zinc y su evaluación en plántulas de *Lactuca sativa*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (28): 299-308. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3284>
- Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3): 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcás, J. Á., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2010). Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ na-noparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental Science & Technology*, 44(19): 7315-7320. <https://doi.org/10.1021/es903891g>
- Mahajan, P., Dhoke, S., Khanna, A., & Tarafdar, J. (2011). Effect of nano-ZnO on growth of mung bean (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Applied Biological Research*, 13(2): 54-61. <https://doi.org/10.1155/2011/696535>
- Mahakham, W., Sarmah, A. K., Maensiri, S., & Theerakulpisut, P. (2017). Nano-priming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1): 1-21. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5>
- Naseeruddin, R., Sumathi, V., Prasad, T. N., Sudhakar, P., Chandrika, V., & Ravindra Reddy, B. (2018). Unprecedented synergistic effects of nanoscale nutrients on growth, productivity of sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], and nutrient biofortification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(5): 1075-1084. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04467>

- Rai-Kalal, P., & Jajoo, A. (2021). Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 160: 341-351. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.032>
- Singh, V. K., Singh, R., Tripathi, S., Devi, R. S., Srivastava, P., Singh, P., Kumar, A., & Bhadouria, R. (2020). Seed priming: state of the art and new perspectives in the era of climate change. *Climate Change and Soil Interactions*, 143-170. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818032-7.00006-0>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, 299: 152-178. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1)
- Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1960). Principles and procedures of statistics. <https://doi.org/10.1002/bimj.19620040313>
- Steinskog, D. J., Tjøstheim, D. B., & Kvamstø, N. G. (2007). A cautionary note on the use of the Kolmogorov–Smirnov test for normality. *Monthly Weather Review*, 135(3): 1151-1157. <https://doi.org/10.1175/mwr3326.1>
- Taladrid, I., & Espinosa, M. (2021). Semillas de rabanitos (*Raphanus sativus* L): observaciones de su morfología bajo microscopía electrónica, germinación y utilidad para estudios de fitotoxicidad. *Polibotánica*, (51): 171-183. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.11>
- Xie, Y., Xu, L., Wang, Y., Fan, L., Chen, Y., Tang, M., Luo, X., & Liu, L. (2018). Comparative proteomic analysis provides insight into a complex regulatory network of taproot formation in radish (*Raphanus sativus* L.). *Horticulture Research*, 5. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0057-7>

CAPÍTULO 4. IMPACTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS, OXIDATIVAS Y EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *Lactuca sativa* L.

4.1 Resumen

El Zn es un nutriente indispensable para los cultivos que suele presentar baja biodisponibilidad. Se han propuesto diferentes técnicas para mejorar la biodisponibilidad del Zn, incluyendo el uso de nanofertilizantes. Este estudio investiga las respuestas fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y moleculares de *Lactuca sativa* a la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) a concentraciones de 40, 50, 60 y 70 mg L⁻¹ bajo condiciones hidropónicas. Se realizaron cuatro aplicaciones de Zn con una frecuencia de 15 días. Se evaluaron la biomasa fresca y seca, las clorofilas a, b y caroteno, los fenólicos, los flavonoides, la capacidad antioxidante, las antocianinas, la vitamina C, la proteína total y la actividad enzimática de CAT, POD y PPO. Paralelamente, se analizó la expresión génica mediante qRT-PCR en tiempo real. También se determinaron las concentraciones de minerales (Zn) en las hojas de las plantas. Los resultados revelaron que las NPs-ZnO a 60 mg L⁻¹ mejoraron significativamente la biomasa fresca y seca, mientras que la relación clorofila a/b y el contenido total de carotenoides aumentaron notablemente a 50 mg L⁻¹, lo que indica una mayor eficiencia fotosintética y actividad metabólica. Las enzimas antioxidantes, incluyendo catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), mostraron una regulación positiva significativa a 60 y 70 mg L⁻¹, reflejando la activación de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo; en contraste, la actividad de polifenol oxidasa (PPO) no presentó cambios significativos. La acumulación de zinc en hojas alcanzó su punto máximo a 50 mg L⁻¹, lo que sugiere una absorción y translocación efectiva. Los resultados preliminares del análisis de expresión génica indican que las NPs-ZnO inducen la regulación positiva de *LsCAT*, *LsPOD* y *LsSOD*, confirmando su papel en la respuesta antioxidante de *Lactuca sativa*. Estos hallazgos sugieren que las NPs-ZnO aplicadas foliarmente modulan respuestas clave tanto a nivel fisiológico como génico, respaldando su uso potencial en la agricultura de precisión y la biofortificación de cultivos mediada por nanotecnología.

Palabras clave: Antioxidantes, expresión génica, qRT-PCR en tiempo real.

4.2 Abstract

Zn is an indispensable nutrient for crops that usually presents low bioavailability. Different techniques have been proposed to improve the bioavailability of Zn, including the use of nano fertilizers. This study investigates the physiological, biochemical, nutritional, and molecular responses of *Lactuca sativa* to foliar application of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) at concentrations of 40, 50, 60, and 70 mg L⁻¹ under hydroponic conditions. Four applications of Zn were made with a frequency of 15 days, the fresh and dry biomass, chlorophyll a, b, and carotene, phenolics, flavonoids, antioxidant capacity, anthocyanins, vitamin C, total protein, and enzymatic activity of CAT, POD, and PPO were evaluated. In parallel, gene expression was analyzed by real-time qRT-PCR. The mineral concentrations (Zn) in the leaves of plants were also determined. Results revealed that ZnO-NPs at 60 mg L⁻¹ significantly enhanced fresh and dry biomass, while chlorophyll a/b ratio and total carotenoids content increased markedly at 50 mg L⁻¹, indicating improved photosynthetic efficiency and metabolic activity. Antioxidant enzymes, including catalase (CAT) and peroxidase (POD), exhibited significant upregulation at 60 and 70 mg L⁻¹, reflecting activation of oxidative stress defense mechanisms; in contrast, polyphenol oxidase (PPO) activity showed no significant change. Zinc accumulation in leaves peaked at 50 mg L⁻¹, suggesting effective uptake and translocation. Preliminary results of gene expression analysis indicate that ZnO-NPs induce upregulation of *LsCAT*, *LsPOD* and *LsSOD*, confirming their role in the antioxidant response of *Lactuca sativa*. These findings suggest that foliar-applied ZnO-NPs modulate key physiological and gene level responses, supporting their potential use in precision agriculture and nano-enabled crop biofortification.

Keywords: Antioxidants, gene expression, real time qRT-PCR.

4.3 Introducción

Alimentar a una población mundial en crecimiento requiere sistemas agrícolas cada vez más eficientes, capaces de producir cultivos con mayor rendimiento y mejor calidad nutricional. Entre los micronutrientes esenciales para el desarrollo vegetal, el zinc (Zn) desempeña un papel esencial, sin embargo, su deficiencia está extendida en suelos agrícolas de muchas regiones del mundo (Garza-Alonso *et al.*, 2023). Por lo tanto, una disponibilidad adecuada de Zn es vital para optimizar tanto la productividad como la calidad de los cultivos (Stanton *et al.*, 2022). Funcionalmente, el Zn participa en una amplia gama de procesos fisiológicos y bioquímicos: actúa como componente estructural y catalítico de numerosas enzimas, contribuye a la estabilidad de lípidos y proteínas, y actúa como cofactor en la biosíntesis de auxinas. Además, el Zn es esencial para el metabolismo de los ácidos nucleicos y desempeña un papel central en la transcripción, el procesamiento y la edición del ARN, especialmente en cloroplastos y mitocondrias (Hansch & Mendel, 2009; Noulas *et al.*, 2018). También es un componente de las membranas celulares, influyendo en la expresión génica, la biosíntesis de clorofila y la fotosíntesis, especialmente a través de su papel en la reparación de la proteína D1 en el fotosistema II dañado por el estrés lumínico (Sturikova *et al.*, 2018).

Ante esta problemática, la nanotecnología emerge como una alternativa innovadora para mejorar la disponibilidad y eficiencia en el uso del Zn en los sistemas agrícolas. En los últimos años, la nanotecnología se ha convertido en una frontera prometedora en la agricultura sostenible, ofreciendo soluciones innovadoras para mejorar la productividad de los cultivos, la calidad nutricional y la tolerancia al estrés (Tiwari *et al.*, 2025). Entre los nanomateriales de ingeniería, las nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) han atraído gran atención debido a su biocompatibilidad, propiedades antimicrobianas y su papel esencial en el metabolismo vegetal como micronutriente (Al Jabri *et al.*, 2022). Varios estudios han reportado que las NPs-ZnO pueden favorecer el crecimiento vegetal y la acumulación de biomasa tanto en condiciones normales como de estrés. Aplicadas en concentraciones controladas, las nanopartículas de ZnO han demostrado efectos positivos en las tasas de germinación, la elongación radicular y el vigor de las plántulas en diversos cultivos (El-Saadony *et al.*, 2022; Mathur *et al.*, 2022). A pesar de estos prometedores resultados, los mecanismos moleculares mediante los cuales las plantas

interactúan con las nanopartículas de ZnO siguen siendo poco conocidos, especialmente en lo que respecta a la regulación génica y las vías de respuesta al estrés.

Una de las principales consecuencias fisiológicas de la exposición a nanopartículas es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que en niveles elevados pueden alterar la homeostasis celular y dañar biomoléculas (Hong *et al.*, 2021). Sin embargo, las ROS también actúan como moléculas de señalización clave involucradas en el desarrollo vegetal, la división celular y la expresión génica (Umair *et al.*, 2024). Por lo tanto, mantener la homeostasis de las ROS es crucial para el funcionamiento óptimo de las plantas. Se ha demostrado que las nanopartículas de ZnO influyen en este equilibrio modulando el sistema de defensa antioxidante, lo que incluye la activación de antioxidantes enzimáticos como la catalasa (CAT), la peroxidasa (POD) y la superóxido dismutasa (SOD), así como la acumulación de antioxidantes no enzimáticos como la prolina y los compuestos fenólicos (Mosa *et al.*, 2018). Comprender cómo las nanopartículas de ZnO afectan el metabolismo oxidativo, la activación antioxidante y la expresión génica es esencial para determinar su uso seguro y eficaz en la agricultura.

En este contexto, nuestro objetivo se centra en la evaluación del estrés fisiológico, oxidativo y los cambios moleculares de las nanopartículas de ZnO aplicadas foliarmente en *Lactuca sativa* L. (lechuga) en un sistema hidropónico.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Localización del experimento

El presente estudio se realizó en una malla sombra del Instituto Tecnológico de Torreón (ITT), durante los ciclos agrícolas otoño-invierno de 2021 y 2023. El ITT está ubicado en el municipio de Torreón, Coahuila, México entre las coordenadas 26° 30' 15" Norte - 103° 22' 07" Oeste.

4.4.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

La malla sombra es una estructura de soporte de acero galvanizado de 2 mm de espesor con perfiles cuadrados de 1,25" y 1,5" y malla anti-insectos (color cristal) con hilos de 25 x 25 pulgadas, calibre 720, polietileno con tratamiento UV de luz difusa y 30% de sombra.

En este estudio se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) de hoja roja de la empresa Seeds of Change, las cuales fueron germinadas en bandejas de foami agrícolas de 144 cavidades y posteriormente trasplantadas a tubos de PVC cuando la plántula presentó de 2 a 3 hojas verdaderas. Los tratamientos consistieron en la aplicación foliar de concentraciones de 40, 50, 60 y 70 mg L⁻¹ de nanopartículas de zinc (NPs-ZnO) más un tratamiento testigo a base de agua destilada. El tamaño de las nanopartículas fue de 67 a 71 nm, con una pureza del 99%, de color blanco y con formas estructurales semiesféricas y poligonales. Fueron sintetizados por el método de Galindo *et al.* (2022) en la Universidad Politécnica de la Región Laguna (UPRL), México.

Se realizaron cuatro aplicaciones foliares de NPs-ZnO, la primera a los 10 días después del trasplante, cuando el cultivo presentó expansión foliar y posteriormente cada 15 días, utilizando atomizadores cilíndricos con un rendimiento de 0.14 mL y para una mejor adherencia, un surfactante no iónico. Se agregó adherente (INEX-A) a una dosis de 1 - 2 ml L⁻¹ de agua de aspersión. Las aplicaciones foliares se realizaron por la mañana y sin presencia de viento. Dependiendo de la etapa fenológica del cultivo los riegos fueron con una determinada concentración (35, 50, 70 y 100%) de la solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961) a un pH de 5.5-6.5 y una conductividad eléctrica (CE) de 2 dS m⁻¹.

La evaluación de los tratamientos se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar. Se cosecharon seis plantas de cada tratamiento, una semana después de las últimas aspersiones para evaluar rendimiento y bioquímicos; y en la segunda etapa se cosecharon tres plantas de cada grupo de tratamiento para evaluar los cambios moleculares del cultivo. La distribución de los tratamientos evaluados se presenta en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Distribución de los tratamientos del diseño experimental completamente al azar de las lechugas producidas en sistema hidropónico NFT.

T ₂ -R ₃	T ₄ -R ₁	T ₅ -R ₂	T ₁ -R ₆	T ₃ -R ₄
T ₁ -R ₁	T ₅ -R ₃	T ₂ -R ₂	T ₃ -R ₁	T ₄ -R ₄
T ₃ -R ₂	T ₄ -R ₅	T ₁ -R ₄	T ₅ -R ₁	T ₂ -R ₅
T ₅ -R ₆	T ₂ -R ₄	T ₃ -R ₃	T ₁ -R ₃	T ₄ -R ₃
T ₄ -R ₂	T ₃ -R ₆	T ₂ -R ₆	T ₅ -R ₄	T ₁ -R ₂
T ₂ -R ₁	T ₁ -R ₅	T ₃ -R ₅	T ₄ -R ₆	T ₅ -R ₅

Donde los tratamientos son:

T₁ = Control

T₂ = 40 mg L⁻¹ NPs-ZnO

T₃ = 50 mg L⁻¹ NPs-ZnO

T₄ = 60 mg L⁻¹ NPs-ZnO

T₅ = 70 mg L⁻¹ NPs-ZnO

4.4.3 Sistema hidropónico NFT

Consiste en una estructura de tubos de PVC de 3 pulgadas de diámetro (Figura 4.1), con una separación de 20 cm entre orificios y con una pendiente del 10%. Contó con una bomba Dúo de ½ hp Igoto Pe60 Riego, esto permitió recircular la solución nutritiva al cultivo.



Figura 4.1. Estructura del sistema hidropónico NFT, para producción de lechuga.

4.4.4 Fitosanidad del cultivo

Se llevó a cabo un manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE), por lo que se inició monitoreando al cultivo en todo momento para evitar infestación de plagas o incidencia de enfermedades, se aplicó de forma preventiva jabón potásico (KOH) que es un bioinsecticida a una dosis de 10 mL por litro de agua, la aplicación se hizo en intervalos de 15 días.

4.4.5 Variables evaluadas

4.4.5.1 Variables morfológicas

4.4.5.1.1 Número de hojas

Para la determinación del número de hojas, se contabilizaron manualmente todas las hojas completamente desarrolladas de cada planta al momento de la cosecha. Se consideraron

únicamente aquellas hojas con limbo definido, independientemente del tamaño, excluyendo hojas emergentes o senescentes.

4.4.5.1.2 Ancho de hoja

El ancho de hoja se midió con una regla milimetrada o vernier digital, tomando como referencia la parte más ancha del limbo foliar de la hoja más desarrollada de cada planta. Esta variable se expresó en centímetros (cm).

4.4.5.1.3 Largo de hoja

El largo de hoja se determinó como la distancia desde la base del pecíolo hasta el ápice de la lámina foliar, utilizando una regla flexible o cinta métrica. La medición se realizó en la hoja más representativa de cada planta (generalmente la hoja central o de mayor tamaño), y los resultados se expresaron en centímetros (cm).

4.4.5.1.4 Altura de planta

Se midió con un flexómetro la altura de la planta al final del ciclo del cultivo, el resultado fue expresado en centímetros (cm).

4.4.5.1.5 Diámetro de corona de la planta

El diámetro de la corona se midió con una cinta métrica al final del ciclo del cultivo. El resultado fue expresado en centímetros (cm).

4.4.5.1.6 Longitud de raíz

Al momento de la cosecha (70 ddt) se tomó la raíz y se midió de punta a punta con una cinta métrica, los datos obtenidos se presentaron en centímetros y sus decimales (cm).

4.4.5.1.7 Peso fresco de raíz

La raíz se cortó y se pesó en una báscula digital de la marca Travessa®, los resultados fueron expresados en gramos (g).

4.4.5.1.8 Peso seco de raíz

Se secó la raíz a temperatura ambiente durante cinco días, posteriormente se introdujo a un horno estufa de la marca Memmert® modelo W02WVU, por 24 h a una temperatura de 75 °C, posteriormente se pesó en una báscula hasta obtener peso constante y los resultados obtenidos fueron expresados en gramos (g).

4.4.5.1.9 Peso fresco de vástago

Se separó cuidadosamente el vástago de la raíz utilizando tijeras de acero inoxidable previamente desinfectadas. Posteriormente, se retiró el exceso de humedad superficial con papel absorbente y se pesó el vástago completo de cada planta utilizando una balanza digital analítica. Los resultados se expresaron en gramos (g).

4.4.5.1.10 Peso seco de vástago

Para obtener el peso seco de vástago, las muestras frescas previamente pesadas fueron colocadas en bolsas de papel y secadas en una estufa a una temperatura constante de 75 ± 2 °C durante 24 horas o hasta alcanzar peso constante. El peso seco de cada vástago se registró en gramos (g).

4.4.5.2 Rendimiento

4.4.5.2.1 Peso fresco

En la cosecha, la planta de lechuga sin raíz se pesó en una báscula digital de la marca Balance®, los resultados obtenidos se expresaron en gramos (g).

4.4.5.2.2 Materia seca

Se secaron las hojas de lechuga a temperatura ambiente durante cinco días, posteriormente se llevaron a un horno estufa de la marca Memmert® modelo W02WVU, por 24 h a una temperatura de 75 °C, después se pesó en una báscula y los resultados obtenidos fueron expresados en gramos (g).

4.4.5.3 Determinación de pigmentos fotosintéticos

La clorofila y los carotenoides fueron detectados en la solución suspendiendo 50 mg de hojas frescas en etanol al 95%, siguiendo el método de Lichtenthaler & Wellburn (1983). El homogenizado se centrifugó a 1500 ×g durante 20 min y se recolectó el sobrenadante. Posteriormente, las lecturas de absorbancia se registraron a 665, 649 y 470 nm en un espectrofotómetro UV-visible Jenway 7305. El contenido se reportó según las ecuaciones (Lichtenthaler & Wellburn, 1983):

$$\text{Chla} = 13.95 A_{665} - 6.88 A_{649}$$

$$\text{Chlb} = 24.96 A_{649} - 7.32 A_{665}$$

$$\text{Car} = (1\,000 A_{470} - 2.05 \text{ Chla} - 114.8 \text{ Chlb}) / 245$$

4.4.5.4 Contenido de compuestos bioactivos

4.4.5.4.1 Contenido total de fenoles

Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron según la metodología de Singleton *et al.* (1999); se utilizaron 300 µL del extracto, añadiendo 1080 µL de agua en un tubo de ensayo, seguido de 120 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, agitando en un vórtex durante 10 s. Después de 10 min, se agregaron 0.9 mL de Na₂CO₃ al 7.5% (p/v) y se agitó por 10 s. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, la absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro Jenway 7305 UV-Vis. Se preparó un estándar con ácido gálico (AG) y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso seco (mg AG 100 g⁻¹ PS).

4.4.5.4.2 Contenido total de flavonoides

Los flavonoides totales se determinaron siguiendo la metodología de Hidalgo *et al.* (2019); 250 µL de extracto etanólico se mezclaron con 1.25 mL de agua y 75 µL de NaNO₂ al 5%. Después de 5 min, se añadieron 150 µL de AlCl₃, y tras 6 min, se añadieron 500 µL de NaOH 1M y 275 µL de agua, agitando en vórtex durante 1 min. Las absorbancias se midieron a 510 nm usando

un espectrofotómetro Jenway 7305 UV-Vis. La curva estándar se preparó con catequina disuelta en etanol absoluto, y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de catequina por 100 g de peso seco (mg EC 100 g⁻¹ PS).

4.4.5.4.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante el método propuesto por Hsu *et al.* (2003), utilizando el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Se preparó una solución de DPPH en etanol a una concentración de 0.025 mg mL⁻¹; se mezclaron 50 µL de extracto etanólico con 1950 µL de la solución de DPPH; tras 30 min, las muestras se cuantificaron a 517 nm en un espectrofotómetro Jenway 7305 UV-Vis. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de DPPH utilizando la ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = (1 - X) * 100$$

Donde, $X = A_{517} \text{ muestra} / A_{517} \text{ blanco}$.

4.4.5.4.4 Contenido relativo de antocianinas

El contenido relativo de antocianinas se determinó según el método descrito por Peppi (2004) y Xu *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.2 g de muestra liofilizada, colocándola en un tubo con 10 mL de metanol al 1% (v/v) de HCl, y se homogeneizó durante 1 min usando un homogeneizador Ultraturrax con una sonda de 10 mm, todo en oscuridad y con los tubos en hielo. La mezcla se sonicó en oscuridad durante 30 min y se incubó durante 24 h. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm, separando el sobrenadante. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Varian (Cary50, Mulgrave, Australia) tomando lecturas a 530 nm. El contenido relativo de antocianinas se expresó como U mg⁻¹ de peso seco (PS). Se utilizó la ecuación:

$$\text{Antocianinas totales} = (A) (PM) (DF) (1000) / \epsilon (6)$$

Donde,

A = absorbancia a 530 nm

PM = peso molecular (449.2)

ϵ = coeficiente de extinción (26900).

4.4.5.4.5 Contenido de vitamina C

El contenido de vitamina C se determinó según la metodología reportada por Padayatt *et al.* (2001). Se pesaron 10 g de hojas frescas, se trituraron con 10 mL de ácido clorhídrico al 2% (v/v), se filtró a través de gasa y se llevó el volumen a 100 mL. De la solución diluida, se tomaron 10 mL y se titularon con 2,6-diclorofenol (1×10^{-3} N) hasta la aparición de color rosa. El contenido de vitamina C se calculó usando la ecuación:

$$\text{Vit. C}(\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ PF}) = \frac{(\text{mL de 2.6 diclorolindofenol})(0.088)(\text{Vol.tot})(100)}{(\text{volumen alicuota})(\text{peso muestra})}$$

4.4.5.5 Proteína

El contenido de proteína soluble en las plantas de lechuga se analizó de acuerdo con el método Bradford (1976). Para la cuantificación de proteína se realizó una curva de calibración preparada con albumina de suero bovino. Los resultados fueron expresados en $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ PS.

4.4.5.6 Actividad enzimática

El extracto crudo enzimáticamente activo se preparó lavando, desinfectando y secando el material vegetal; luego, se cortaron 100 g de material y se homogeneizaron en una licuadora con 50 mL de tampón fosfato de potasio 0.1 M durante 3 min, en intervalos de 30 s. El homogenado se mantuvo a 4 °C durante 24 h, se filtró a través de gasa y el líquido fue centrifugado a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C.

4.4.5.6.1 Catalasa

La actividad de la enzima catalasa (CAT 1.11.1.6) se midió siguiendo el método de Aebi (1983). Se midió en un espectrofotómetro Jenway 7305 UV-Vis a temperatura ambiente, registrando la

disminución de la absorbancia a 240 nm causada por la descomposición del H_2O_2 . Se utilizó el coeficiente de extinción ($\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el contenido de proteína (Bradford, 1976) para calcular la actividad enzimática, expresada como U mg^{-1} de proteína.

4.4.5.6.2 Peroxidasa

La actividad de la enzima peroxidasa (POD 1.11.1.7) se midió utilizando guayacol como donador de hidrógeno (Onsa *et al.*, 2004). Se registró el aumento de absorbancia a 470 nm por la oxidación del guayacol en presencia de H_2O_2 . Se utilizó el coeficiente de extinción ($\epsilon_{470} = 5.57 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el contenido de proteína (Bradford, 1976). La actividad enzimática se expresó como U mg^{-1} de proteína.

4.4.5.6.3 Polifenol oxidasa

La actividad de la polifenol oxidasa (PPO 1.14.18.1) se midió siguiendo el método de Oktay *et al.* (1995). La actividad se determinó espectrofotométricamente (Jenway 7305 UV-Vis) registrando el aumento de absorbancia a 420 nm debido a la descomposición del catecol. Se utilizó el coeficiente de extinción ($\epsilon_{420} = 3450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el contenido de proteína (Bradford, 1976). La actividad enzimática se expresó como U mg^{-1} de proteína.

4.4.5.7 Cuantificación de zinc en las hojas

La concentración de Zn se analizó en un laboratorio certificado que se encuentra en el Instituto Tecnológico de Aguascalientes (ITA). Las muestras fueron digeridas mediante tratamiento térmico empleando ácido nítrico y una mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico. La concentración de zinc se cuantificó en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Thermo Scientific® AAS iCE 3000 en modo flama y empleando una curva de calibración. Los resultados corresponden a la porción soluble de la muestra. Se reportó en $\mu\text{g g}^{-1}$ PS.

4.4.5.8 Expresión génica

4.4.5.8.1 Aislamiento de ARN total

Las hojas congeladas de lechuga se trituraron completamente con nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo fríos. El ARN total se aisló utilizando el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo Quick-Start. La concentración y pureza del ARN se evaluaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm usando un NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Una relación cercana a 2.0 entre las absorbancias a 260/280 nm indicó ARN puro. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa al 1%.

4.4.5.8.2 Síntesis de ADNc por transcripción inversa

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total mediante transcripción inversa. Se incubó 1 µg de ARNm con 1 µL de Oligo(dT)12-18 de Promega en un volumen final de 12 µL con agua libre de RNasa y DNasa, a 70 °C durante 10 min. Luego, se añadió una segunda mezcla de reacción con 6 µL de tampón 10x para retrotranscripción, 1 µL de mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 µL de transcriptasa inversa M-MLV de Promega, incubando 60 min a 37 °C y 10 min a 70 °C. El ADNc obtenido se almacenó a 4 °C hasta su uso en los análisis posteriores.

4.4.5.8.3 Análisis de expresión génica

Los análisis de expresión génica se realizaron usando cebadores específicos para: catalasa (*LsCAT*), peroxidasa N1 (*LsPOD*), superóxido dismutasa [Fe] 3 cloroplástica (*LsSOD*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica (*LsGAPDH*) y beta-tubulina (*LsTUB*). Los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias completas reportadas en GeneBank (NCBI) usando las herramientas Primer3, Oligo Analyzer y PCR Test (Cuadro 4.2).

Las condiciones de PCR se optimizaron mediante un gradiente de temperaturas de alineamiento. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y se visualizaron bajo luz UV tras tinción con bromuro de etidio. La especificidad de los amplicones se confirmó mediante secuenciación y análisis de alineamiento en BLAST (NCBI).

Cuadro 4.2. Secuencias de cebadores para análisis de qRT-PCR.

Gen	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Tamaño del producto (pb)
<i>LsCAT</i>	Forward primer	CATCGCCTTGGACCTAACTA	57.85	277
	Reverse primer	ACCGTTCTTGTCTGTCTGGA	58.27	
<i>LsPOD</i>	Forward primer	CCAAGAGTTGAAGCCATTGT	57.80	291
	Reverse primer	AGCCAGAAGCACAGAATCAC	58.03	
<i>LsSOD</i>	Forward primer	AAAGAGGAATGAGCAACGAC	56.98	268
	Reverse primer	AGGGAGAGAAGAGGGATGTT	56.81	
<i>LsGAPDH</i>	Forward primer	AGCACGAGGTCAAAGTCAAG	58.09	207
	Reverse primer	TTGGAGCAGAAATCACAACC	58.70	
<i>LsTUB</i>	Forward primer	TCTGATTCCATTCCCTCGTC	60.01	212
	Reverse primer	CCACCTCTTTCGTGCTCATT	60.25	

Finalmente, la PCR cuantitativa en tiempo real (Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR) se llevó a cabo con el fin de investigar la variación transcripcional entre los grupos de tratamiento y el control. Para evaluar las diferencias en la transcripción, el cálculo de la expresión relativa de cada gen se realizó de acuerdo con el método delta-delta Ct (fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$).

4.4.5.9 Análisis estadístico

Todos los datos presentados son valores promedio de tres repeticiones. Las variables fueron analizadas mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) en el paquete estadístico SAS versión 9.1.

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Variables morfológicas

La aplicación de NPs-ZnO en diferentes concentraciones mostró efectos diferenciados sobre las variables morfológicas y de biomasa en las plantas de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Cuadro 4.3).

En cuanto al número de hojas, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), con valores que oscilaron entre 31 hojas en el tratamiento control y 40 hojas en la concentración de 40 mg L⁻¹.

Respecto al ancho de hoja, se observó un incremento significativo en la concentración de 70 mg L⁻¹ (30.66±1.75 cm), siendo estadísticamente superior al control (23.66±3.17 cm). Las concentraciones intermedias de 40 a 60 mg L⁻¹ presentaron valores intermedios y no significativamente diferentes del control. El largo de hoja también se incrementó con la aplicación de NPs-ZnO. La hoja más larga se registró en la concentración de 40 mg L⁻¹, significativamente superior al control y las demás concentraciones no difirieron estadísticamente del valor máximo, aunque todas superaron al tratamiento control.

En relación con la altura de planta y el diámetro de corona, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), aunque se registraron valores ligeramente superiores en las concentraciones de 50 y 70 mg L⁻¹, respectivamente.

El peso fresco de raíz incrementó significativamente con la aplicación de NPs-ZnO, destacando la concentración de 50 mg L⁻¹ con un valor promedio de 214 g, comparado con el control. De igual manera, el peso seco de raíz fue mayor.

En cuanto al peso fresco del vástago, los tratamientos con 50 y 60 mg L⁻¹ presentaron los valores más altos, mientras que el control fue significativamente inferior. El peso seco de vástago mostró su valor más alto en 60 mg L⁻¹.

Cuadro 4.3. Efecto de las NPs-ZnO sobre las variables morfológicas y de biomasa en las plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

Variables	Concentración NPs-ZnO				
	Control	40 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	60 mg L ⁻¹	70 mg L ⁻¹
No. Hojas	31.00±6.08 a	40.00±3.46 a	34.33±3.51 a	38.33±5.13 a	38.66±4.72 a
Ancho de hoja (cm)	23.66±3.17 b	26.75±1.56 ab	27.91±1.46 ab	27.50±2.59 ab	30.66±1.75 a
Altura de hoja (cm)	21.16±1.75 b	26.00±1.00 a	25.33±3.05 ab	24.66±1.44 ab	25.66±0.76 ab
Altura de planta (cm)	29.00±2.64 a	30.83±3.78 a	33±1.00 a	31.00±1.00 a	29.33±3.21 a
Diámetro de corona (cm)	45.66±5.13 a	51.33±1.15 a	50.66±5.77 a	51.00±2.64 a	53.33±0.57 a
Longitud de raíz (cm)	53.00±4.58 a	55.66±7.5 a	55.80±7.21 a	56.00±2.64 a	51.66±2.08 a
Peso fresco de raíz (g)	130.66±13.01 b	194.66±11.71 a	214.33±25.65 a	184.66±4.16 a	184.00±15.62 a
Peso seco de raíz (g)	16.07±0.09 b	21.45±1.89 a	24.77±2.42 a	21.22±1.43 a	21.83±2.05 a
Peso fresco de vástago (g)	76.00±20.00 b	133.33±12.05 a	158.66±29.00 a	129.33±22.30 a	106.66±6.11 ab
Peso seco de vástago (g)	8.55±2.75 c	19.62±1.06 b	23.66±0.20 ab	24.98±1.70 a	20.13±2.72 ab

*Valores con letras distintas dentro de una misma fila, indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). (±) desviación estándar.

El uso de NPs-ZnO ha mostrado efectos bioestimulantes en cultivos hortícolas como la lechuga. Preciado-Rangel *et al.* (2024) evaluaron aplicaciones foliares de NPs-ZnO a concentraciones de 50, 75 y 100 mg L⁻¹ en el cultivar y reportaron incrementos de biomasa fresca de hasta 103% a 75 mg L⁻¹. Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se observaron incrementos significativos en el peso fresco de raíces y vástagos a concentraciones de 50–60 mg L⁻¹, lo que sugiere un efecto positivo de las NPs-ZnO sobre la acumulación de biomasa vegetal.

Hasan *et al.* (2024) analizaron los efectos de NPs-ZnO (25, 50 y 100 ppm) sobre el crecimiento y anatomía de *Lactuca sativa*. Sus resultados mostraron una estimulación del crecimiento foliar, aumento de biomasa total y mejora en la actividad antioxidante a concentraciones bajas y medias (25–50 ppm). Sin embargo, dosis más altas (100 ppm) generaron inhibición del crecimiento radicular y reducción en la actividad antioxidante. Esta tendencia coincide con los hallazgos del presente estudio, donde el número de hojas y la altura de la planta no mostraron incrementos significativos a dosis elevadas, lo que sugiere que el efecto de las NPs-ZnO sigue un modelo dosis-dependiente, con respuestas óptimas en un rango medio.

4.5.2 Rendimiento

El peso fresco total de planta aumentó con las concentraciones de NPs-ZnO: desde 520.67 g en el tratamiento control hasta 1146 g a 70 mg L⁻¹. Simultáneamente, el peso seco de planta presentó un incremento notable, pasando de 47.38 g en el tratamiento control a un máximo de 104.28 g a 60 mg L⁻¹, seguido por una reducción parcial en 70 mg L⁻¹ (65.96 g). Estos resultados indican una tendencia positiva de acumulación de biomasa fresca y seca con la aplicación de NPs-ZnO, con una respuesta óptima alrededor de 60 mg L⁻¹ (Figura 4.2).

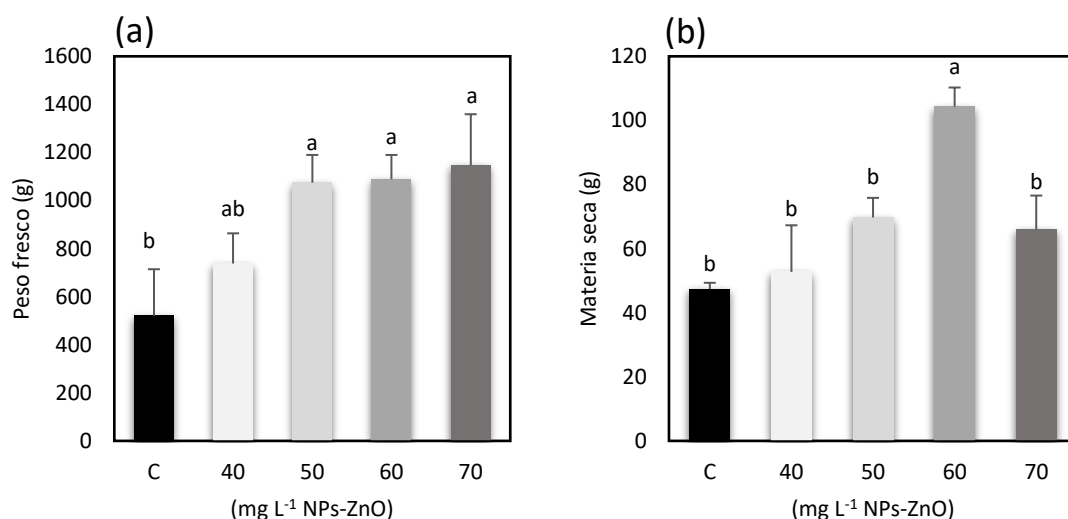


Figura 4.2. Biomasa fresca (a) y seca (b) (g) de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO. Las barras verticales indican la desviación

estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

El incremento en la biomasa fresca observado con la aplicación de NPs-ZnO, sugiere un efecto bioestimulante de estas nanopartículas sobre el crecimiento vegetal. Este comportamiento podría estar relacionado con la mejora en la actividad fotosintética, absorción de nutrientes y eficiencia en el metabolismo celular (Ahmed *et al.*, 2024).

La disminución en peso seco en dosis mayores puede relacionarse con mecanismos de fitotoxicidad como liberación excesiva de iones Zn^{2+} , producción de ROS, daño a membranas celulares y alteración de la estructura radicular. Estos mecanismos han sido descritos en modelos como trigo, haba y arroz, y explican la reducción de biomasa a altas concentraciones de ZnO-NPs (Elsherif *et al.*, 2023; Garza-Alonso *et al.*, 2023).

4.5.3 Pigmentos fotosintéticos

La relación de Cla / Clb varió significativamente entre tratamientos (Figura 4.3). El valor más alto fue registrado en el tratamiento con 50 mg L⁻¹ de NPs-ZnO (2.45 ± 0.02), seguido por 70 mg L⁻¹ (2.33 ± 0.09), mientras que el valor más bajo se observó en 60 mg L⁻¹ (1.93 ± 0.03). El tratamiento control y el tratamiento 40 mg L⁻¹ de NPs-ZnO mostraron valores intermedios.

El contenido de clorofila total en las plantas de lechuga mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos con diferentes concentraciones de NPs-ZnO (Figura 4.3). El valor más alto se observó en el tratamiento con 50 mg L⁻¹ (19.50 ± 0.34), seguido por 40 mg L⁻¹ (18.67 ± 0.08), ambos significativamente superiores respecto al control (13.06 ± 0.14). El tratamiento con 60 mg L⁻¹ (14.31 ± 0.21) presentó un valor intermedio, mientras que la aplicación de 70 mg L⁻¹ resultó en el contenido más bajo (12.61 ± 0.14), similar al tratamiento control.

El contenido de carotenoides en las plantas de lechuga mostró una respuesta significativa ($p \leq 0.05$) ante la aplicación de diferentes concentraciones de NPs-ZnO (Figura 4.3). El tratamiento con 50 mg L⁻¹ presentó la concentración más alta de carotenoides, significativamente superior al resto de los tratamientos. Le siguió el tratamiento con 40 mg L⁻¹, mientras que los tratamientos

con 60 mg L⁻¹ y 70 mg L⁻¹ mostraron valores estadísticamente similares. El contenido más bajo se registró en el control sin aplicación de NPs-ZnO.

La relación de clorofila total /carotenoides se modificó significativamente ($p \leq 0.05$) con la aplicación de NPs-ZnO en las plantas de lechuga (Figura 4.3). El tratamiento control mostró la relación más alta, seguido por los tratamientos con 40 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ y 60 mg L⁻¹. En contraste, el tratamiento con 70 mg L⁻¹ presentó la menor relación.

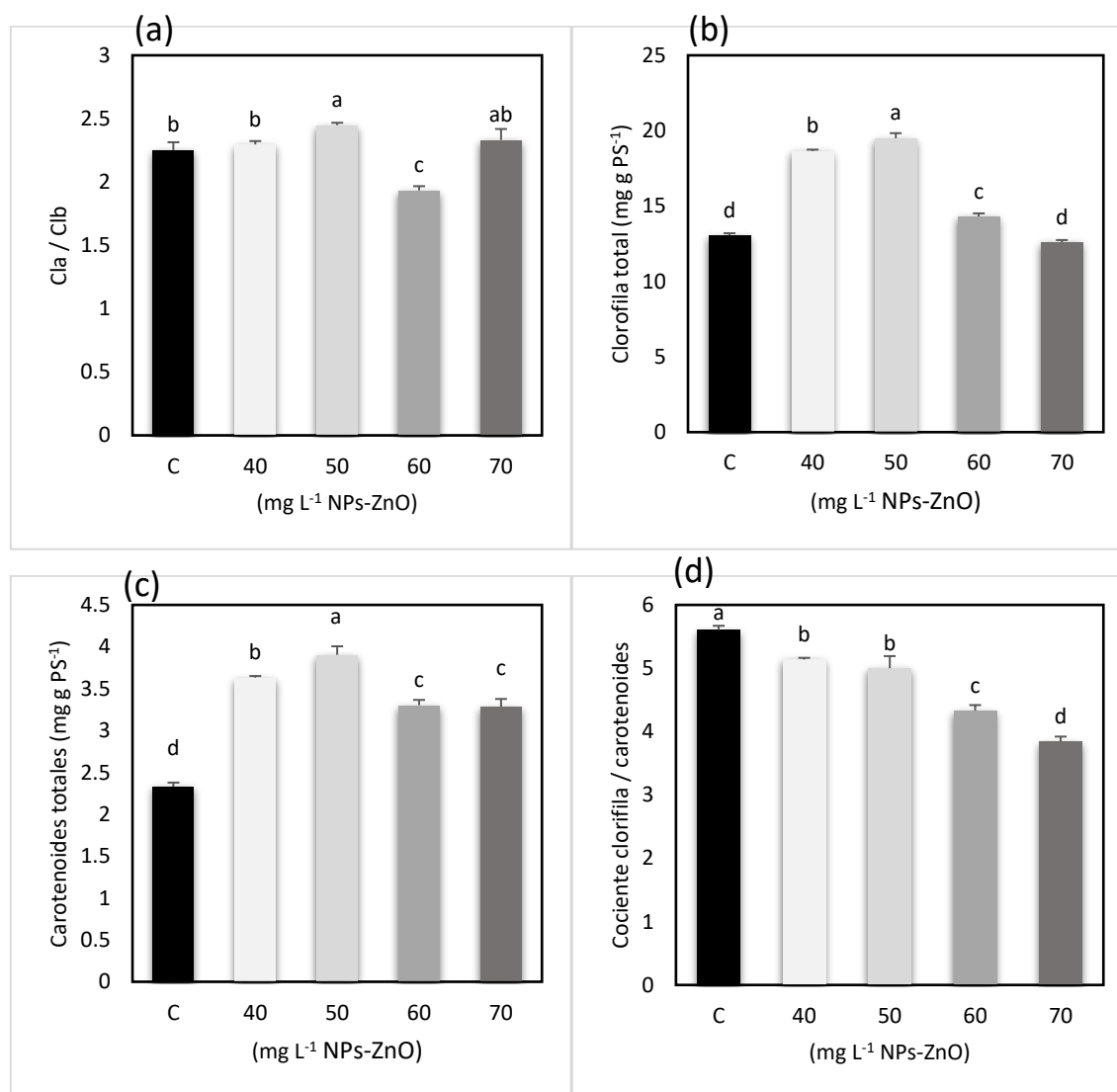


Figura 4.3. Pigmentos fotosintéticos de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO. (a) Relación Cla / Clb, (b) Clorofila total, (c) Carotenoides totales, (d) Cociente clorofila / carotenoides. Las barras verticales indican la

desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

La relación clorofila a/b es un indicador importante del equilibrio fotosintético y de la estructura del aparato fotosintético. Un aumento en esta relación puede reflejar una mayor proporción de clorofila a, implicando una mayor eficiencia en la captación de luz por parte de los fotosistemas (Kalaji *et al.*, 2014).

Una vez que las NPs-ZnO entran en las células, el Zn desempeña un papel vital en la biosíntesis de clorofilas mediante la producción de proteínas LHC, lo que aumenta el contenido de clorofila. Además, este mismo elemento participa en el desarrollo de los cloroplastos mediante la expresión de siete genes responsables de la estructura de la membrana de los tilacoides (Garza-Alonso *et al.*, 2023).

Por otro lado, la disminución de la relación Cla/Clb se puede explicar porque las nanopartículas promueven la actividad de la enzima clorofila a oxigenasa (EC 1.14.13.122), responsable de sintetizar Chlb a partir de Chla. La reducción de la relación y el aumento de Chlb indican una mayor concentración de PSII frente a PSI, ya que Chlb es abundante en PSII. Un mayor PSII implica una captación y un uso más eficientes de la radiación solar en las hojas. Además de lo anterior, la Chlb cumple funciones esenciales, como la estabilización de los LHC y la organización de las membranas tilacoidales.

Los carotenoides desempeñan un papel esencial en la protección del aparato fotosintético frente a la fotooxidación, actuando como antioxidantes naturales. El aumento observado en su concentración bajo tratamientos con 40 y 50 mg L⁻¹ sugiere un efecto positivo de las NPs-ZnO a dosis moderadas, probablemente al mejorar la disponibilidad de zinc como cofactor de enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides (Tripathi *et al.*, 2017). Este efecto estimulante ha sido reportado en otros cultivos donde la aplicación de NPs-ZnO promovió el metabolismo de pigmentos y compuestos antioxidantes (Rastogi *et al.*, 2017).

En contraste, las concentraciones más altas (60 y 70 mg L⁻¹) no favorecieron una mayor acumulación de carotenos, lo que podría atribuirse a efectos citotóxicos de las nanopartículas a dosis elevadas, como la producción de especies reactivas de oxígeno, alteración en la expresión génica o peroxidación lipídica. Estos resultados respaldan la hipótesis de que existe un umbral óptimo de concentración de NPs-ZnO para mejorar el metabolismo de pigmentos sin comprometer la integridad celular.

4.5.4 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos presentes en plantas, tales como proteínas, fenoles, flavonoides, taninos, antocianinas y vitamina C, desempeñan un papel fundamental en la defensa antioxidante y en la adaptación a condiciones de estrés abiótico, los resultados se presentan en la Figura 4.4.

La acumulación de compuestos fenólicos totales en las hojas de *Lactuca sativa* se vio significativamente influenciada por la aplicación foliar de NPs-ZnO. Las concentraciones crecientes de nanopartículas promovieron un aumento progresivo en el contenido de fenoles, alcanzando su máximo valor con el tratamiento de 70 mg L⁻¹ (35.07 ± 0.51 mg AG g⁻¹ PS), el cual fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos ($p \leq 0.05$).

El contenido de fenoles tipo taninos en *Lactuca sativa* mostró una respuesta diferencial frente a las concentraciones crecientes de NPs-ZnO. Las plantas tratadas con 70 mg L⁻¹ presentaron un aumento altamente significativo en la acumulación de taninos (0.9117 ± 0.0024 mg g⁻¹ PS), en comparación con los demás tratamientos, los cuales se mantuvieron en un rango entre 0.4802 y 0.6151 mg g⁻¹ y fueron agrupados estadísticamente en la categoría b según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

La aplicación foliar de NPs-ZnO generó un efecto positivo y estadísticamente significativo en la acumulación de flavonoides en hojas de *Lactuca sativa*. El contenido más alto se registró en el tratamiento con 70 mg L⁻¹, con un valor de 84.73 ± 0.44 mg g⁻¹ PS, clasificado dentro del grupo estadístico a según el test de Tukey ($p \leq 0.05$), lo cual representa un aumento del 76.5% en comparación con el tratamiento control (47.98 ± 0.20 mg g⁻¹ PS, grupo d).

La actividad antioxidante, medida como el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH⁺, evidenció un incremento significativo en respuesta a la aplicación de NPs-ZnO. El tratamiento control presentó el menor porcentaje de inhibición, mientras que todos los tratamientos con nanopartículas indicaron una mejora significativa en la capacidad antioxidante foliar.

El contenido de antocianinas en hojas de *Lactuca sativa* fue significativamente influenciado por los tratamientos con NPs-ZnO, mostrando un patrón no lineal en su acumulación. La mayor concentración se observó en el tratamiento con 40 mg L⁻¹.

El análisis del contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en las plantas de *Lactuca sativa* tratadas con NPs-ZnO no mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$). Lo cual indica que su biosíntesis no fue estimulada por la presencia de NPs-ZnO.

Los resultados obtenidos revelan que la aplicación foliar de NPs-ZnO en *Lactuca sativa* induce una modulación significativa en los perfiles bioquímicos asociados al metabolismo primario y secundario, así como en la capacidad antioxidante no enzimática.

Respecto a los metabolitos secundarios, los fenoles totales, flavonoides y taninos aumentaron significativamente con el tratamiento, destacando la concentración de 70 mg L⁻¹ como la más efectiva. Debido a lo anterior, al exponerse a los nanomateriales, las plantas tienden a aumentar la producción de compuestos antioxidantes como mecanismo de defensa, por ejemplo, compuestos fenólicos y flavonoides, lo cual se evidenció en este trabajo (García-López *et al.*, 2019).

La actividad antioxidante (DPPH⁺) se incrementó notablemente en todos los tratamientos con NPs-ZnO, alcanzando valores superiores al 90% de inhibición con 50 y 60 mg L⁻¹. Este comportamiento sugiere una estrecha relación con la acumulación de metabolitos secundarios antioxidantes como flavonoides y fenoles, los cuales poseen grupos hidroxilo capaces de donar electrones para estabilizar radicales libres (Rudrapal *et al.*, 2022).

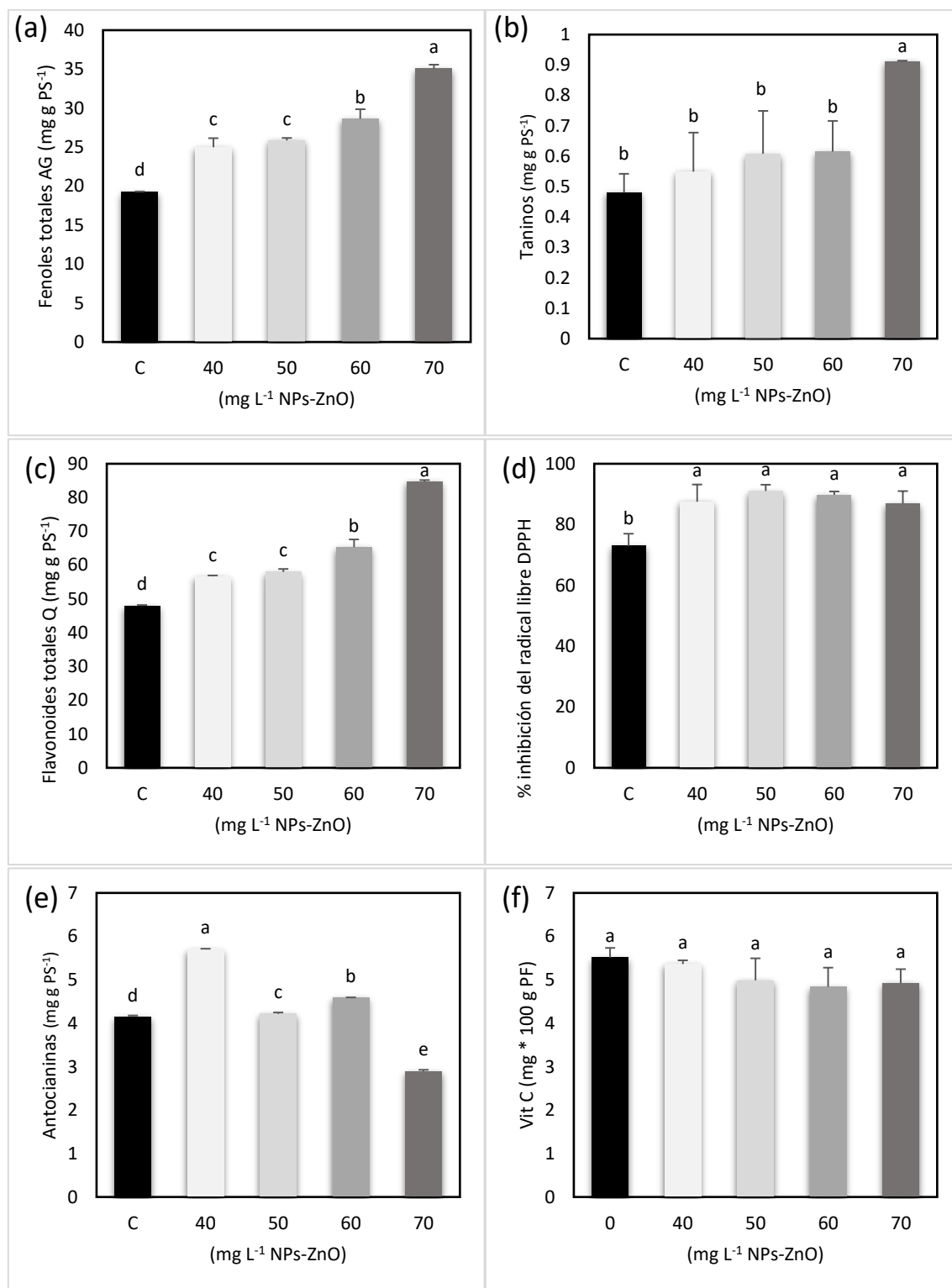


Figura 4.4. Compuestos bioactivos de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO. (a) Fenoles totales, (b) Taninos, (c) Flavonoides

totales, (d) % inhibición del radical libre DPPH, (e) Antocianinas, (f) Vitamina C. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.5.5 Actividad enzimática

Las concentraciones crecientes de NPs-ZnO aplicadas foliarmente en *Lactuca sativa* promovieron respuestas diferenciadas en el sistema antioxidante enzimático y en la acumulación de proteínas (Figura 4.5). La actividad de catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) mostró incrementos significativos a partir de 50 mg L^{-1} , alcanzando su punto máximo con 70 y 60 mg L^{-1} respectivamente, lo que sugiere una activación del sistema de defensa frente al estrés oxidativo inducido por las nanopartículas. En contraste, la polifenoloxidasas (PPO) no presentó diferencias estadísticas entre tratamientos, lo que indica que su participación en la respuesta fue limitada o no inducida por el estrés generado. Por otro lado, el contenido de proteína total se elevó significativamente con la dosis de 60 mg L^{-1} , señalando una posible estimulación de rutas biosintéticas vinculadas al metabolismo general y al estrés.

A nivel celular, el estrés oxidativo se produce cuando diversas generaciones de ROS provocadas por estrés abiótico (como el oxígeno singlete, $^1\text{O}_2$; el superóxido, O_2^- ; el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 ; el radical hidroxilo, $\text{OH}^\cdot$) superan el ritmo de su metabolismo. Entre los principales antioxidantes enzimáticos, la catalasa, la peroxidasa y la polifenol oxidasa son enzimas hemo representativas, encargadas de metabolizar las ROS provocadas por estrés y controlar sus posibles efectos en el metabolismo y las funciones celulares. La aplicación de nanopartículas de ZnO podría estimular la actividad enzimática, como se demuestra en este estudio (Fortis-Hernández *et al.*, 2023).

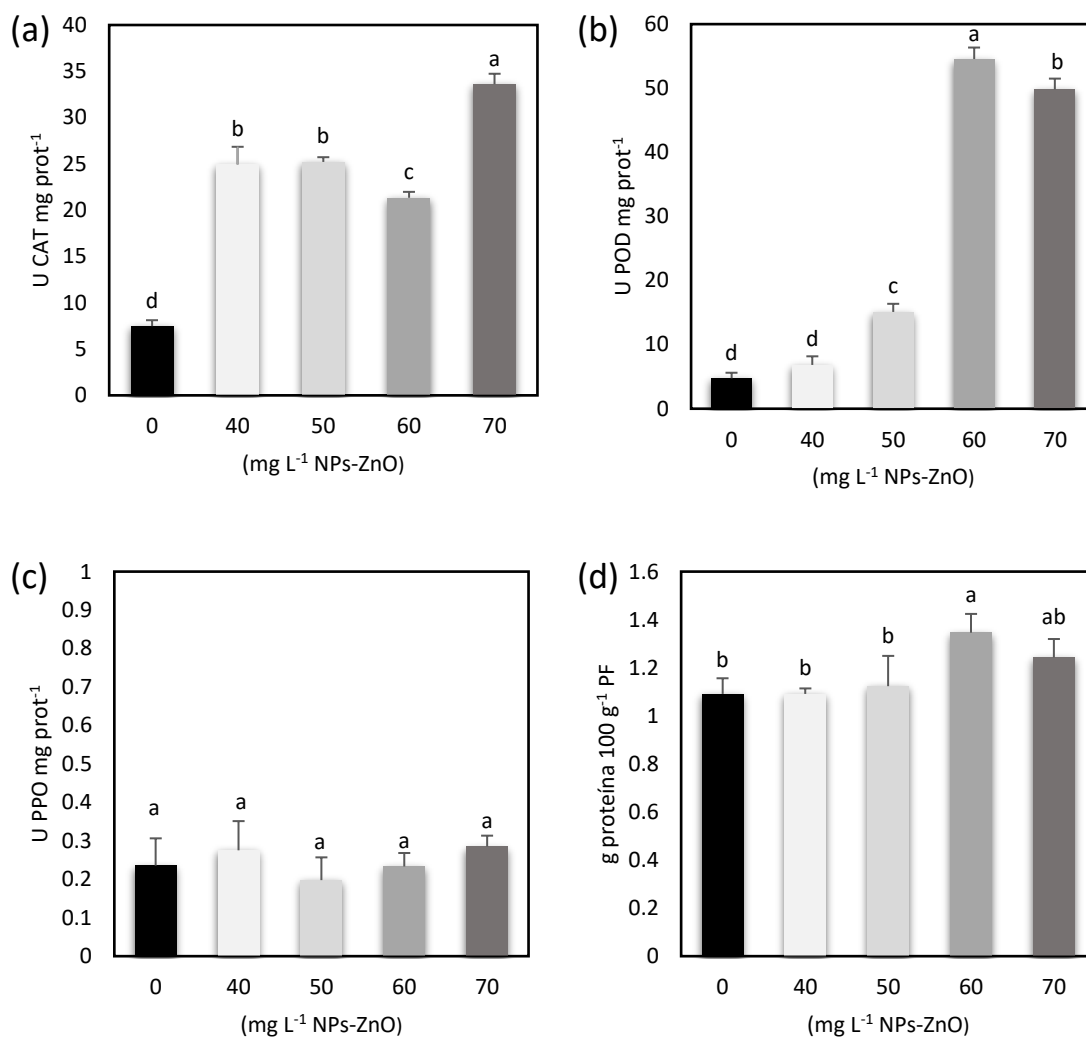


Figura 4.5. Actividad enzimática catalasa (a), peroxidasa (b), polifenol oxidasa (c) y contenido de proteína (d) de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.5.6 Contenido de Zinc

El contenido de Zn en tejido foliar de *Lactuca sativa* mostró una respuesta dosis-dependiente ante la aplicación foliar de NPs-ZnO, con un incremento significativo a 50 mg L⁻¹, lo que indica una mayor absorción a esta concentración óptima. Dosis más bajas o más altas no superaron al tratamiento control, sugiriendo una posible saturación o regulación del transporte de zinc en condiciones de exceso. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Rani *et al.* (2022), quienes señalan que las plantas ajustan la acumulación de micronutrientes como respuesta a la disponibilidad externa, evitando toxicidad por sobrecarga. La mayor eficiencia a 50 mg L⁻¹ podría estar asociada al tamaño nanométrico y propiedades fisicoquímicas de las partículas, que facilitan su ingreso foliar.

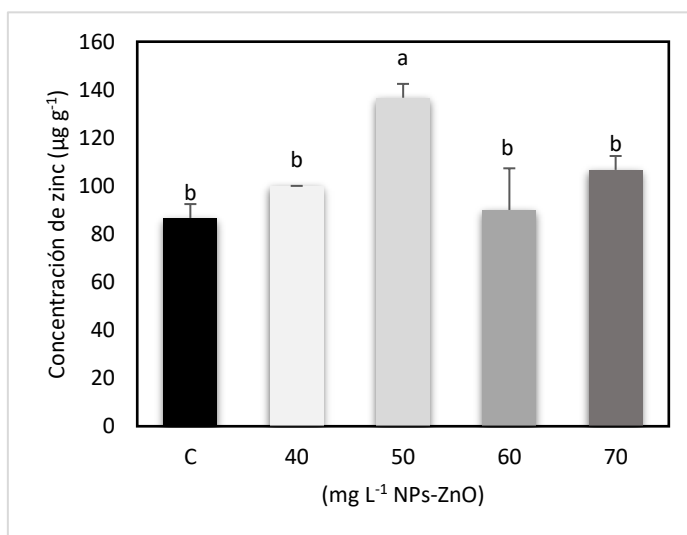


Figura 4.6. Contenido de zinc en las plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.5.7 Expresión génica

La extracción de RNA total a partir de tejido foliar de lechuga permitió obtener concentraciones en un rango de 134–567 ng μl^{-1} , con valores de pureza adecuados ($A_{260}/280 = 2.0\text{--}2.1$), lo cual indica una mínima presencia de contaminantes como proteínas o compuestos fenólicos (Figura 4.7). La integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa, observándose en la mayoría de las muestras dos bandas bien definidas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S, lo que confirma una adecuada preservación del material genético.

No obstante, en algunas muestras se evidenció la presencia de RNA degradado, lo cual se asocia a la actividad de ribonucleasas endógenas o a ligeras variaciones en el proceso de extracción (Figura 4.7, carriles señalados). A pesar de ello, la mayoría de las extracciones mostraron perfiles de integridad aceptables para su empleo en análisis posteriores de expresión génica.

Estos resultados validan la eficiencia del protocolo de aislamiento de RNA en tejidos vegetales con diferente exposición a nanopartículas de óxido de zinc, garantizando la obtención de material de alta calidad para el estudio de la regulación transcripcional de genes antioxidantes. La confirmación de la integridad y pureza del RNA constituye un paso crítico para asegurar la confiabilidad de los análisis de expresión, especialmente considerando que la presencia de compuestos secundarios en lechuga y el posible efecto de las NPs-ZnO pueden comprometer la estabilidad del RNA extraído.

Una vez confirmada la integridad y pureza del RNA total extraído de hojas de lechuga bajo tratamientos con diferentes concentraciones de NPs-ZnO, se procedió a la síntesis de cDNA. Este paso es fundamental para garantizar que los análisis de expresión génica reflejen fielmente los niveles de transcritos presentes en las muestras.

La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando cantidades estandarizadas de RNA de alta calidad, lo que permitió obtener cDNAs con buena representatividad de los genes de interés.

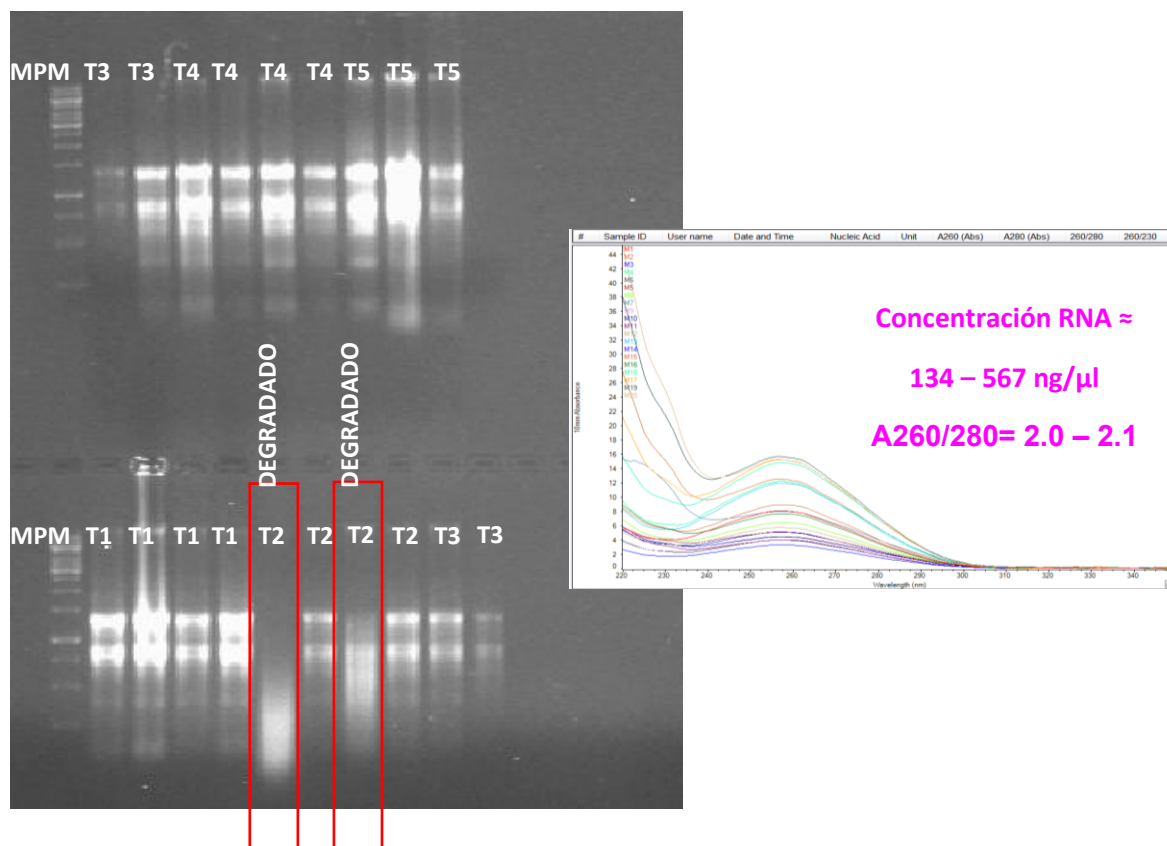


Figura 4.7. Electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa para la evaluación de la integridad y calidad del RNA total extraído de tejido foliar de *Lactuca sativa* tratado con NPsZnO. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (MPM), (T1: tratamiento control; T2: 40 mg L⁻¹; T3: 50 mg L⁻¹; T4: 60 mg L⁻¹ y T5: 70 mg L⁻¹ de NPs-ZnO).

La electroforesis en gel de agarosa permitió confirmar la amplificación de los genes relacionados con la respuesta antioxidante *LsCAT*, *LsPOD* y *LsSOD*, así como de los genes de referencia *LsTUB* y *LsGAPDH* (Figura 4.8). Se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado en las diferentes condiciones del gradiente de temperatura evaluado. Entre las temperaturas probadas, los mejores resultados se observaron a 57.1 °C, donde las bandas fueron más nítidas, intensas y con mínima amplificación inespecífica, por lo que esta condición fue seleccionada como la óptima. Es importante señalar que, mientras *LsTUB* mostró una amplificación consistente y estable en todas las condiciones, *LsGAPDH* presentó variabilidad

en la intensidad de las bandas y la aparición de una banda adicional por debajo del tamaño esperado, lo que llevó a su descarte como gen de referencia.

La amplificación específica de *LsCAT*, *LsPOD* y *LsSOD* confirma la eficacia del diseño de oligonucleótidos para el estudio de la respuesta al estrés oxidativo en plantas de lechuga tratadas con nanopartículas de óxido de zinc. La optimización de la temperatura de alineamiento mediante PCR en gradiente resultó esencial para garantizar la especificidad de la reacción, siendo 57.1 °C la condición más adecuada. Respecto a los genes de referencia, la estabilidad de *LsTUB* respalda su idoneidad como control interno confiable, mientras que las inconsistencias detectadas en *LsGAPDH* justifican su exclusión del análisis. Estos resultados fortalecen la base metodológica para el estudio de la regulación transcripcional de enzimas antioxidantes bajo condiciones de estrés inducido por nanopartículas, aportando evidencia clave al entendimiento de las interacciones planta-nanomaterial.

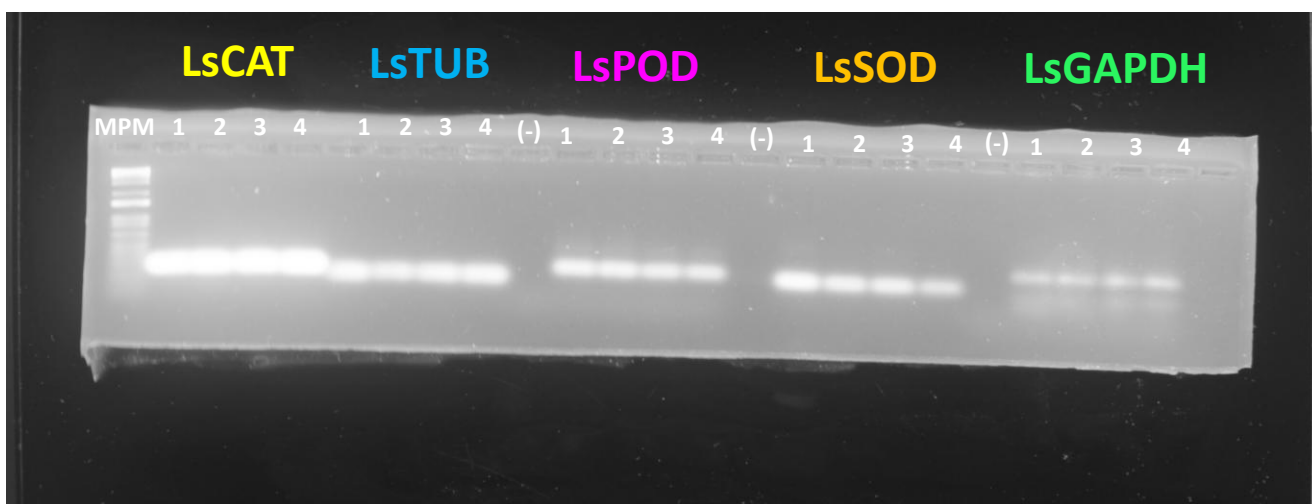


Figura 4.8. Validación de oligonucleótidos mediante PCR en gradiente para genes antioxidantes (*LsCAT*, *LsPOD*, *LsSOD*) y genes de referencia (*LsTUB*, *LsGAPDH*) en lechuga tratada con nanopartículas de óxido de zinc. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (MPM), los números del 1 al 4 corresponden a las diferentes temperaturas de alineamiento evaluadas en el termociclador (carril 1: 56.1 °C; carril 2: 57.1 °C; carril 3: 58.0 °C; carril 4: 59.0 °C). El carril (–) corresponde al control negativo sin ADN molde.

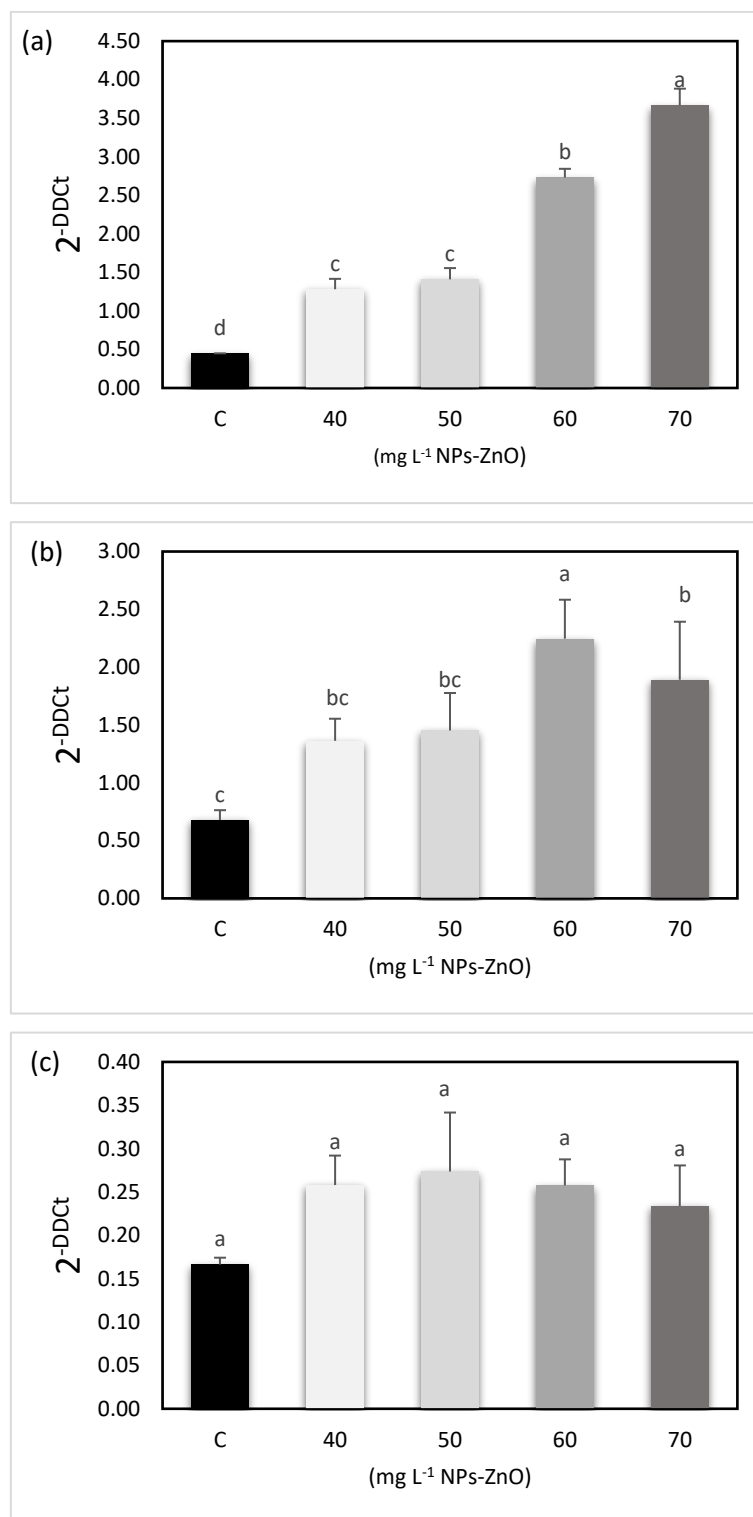


Figura 4.9. Variación en la expresión relativa de CAT (a), POD (b) y SOD (c) en las plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas bajo diferentes concentraciones de NPs-ZnO. Las barras

verticales indican la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

La cuantificación relativa de la expresión génica de CAT mostró diferencias significativas entre los tratamientos con NPs-ZnO (Figura 4.9). El tratamiento control presentó el nivel más bajo de transcripción (0.45 ± 0.0047). En los tratamientos de 40 y 50 mg L⁻¹ (1.28 ± 0.1356 y 1.41 ± 0.1464 respectivamente), la expresión se acercó al nivel basal, indicando una recuperación parcial de la transcripción. Por el contrario, el tratamiento de 60 mg L⁻¹ (2.73 ± 0.1138) y 70 mg L⁻¹ (3.66 ± 0.2196) mostraron una inducción marcada del gen CAT, con un aumento de hasta ocho veces en comparación con el tratamiento control, lo que sugiere una respuesta dosis-dependiente en la activación de este sistema antioxidante. Estos resultados reflejan que la exposición a concentraciones crecientes de NPs-ZnO promueve la sobreexpresión de catalasa como un mecanismo adaptativo para contrarrestar el estrés oxidativo inducido, reforzando la hipótesis de que estas nanopartículas no solo aportan zinc como micronutriente, sino que también actúan como moduladores del sistema antioxidante a nivel transcripcional. De manera similar, la expresión de POD presentó un incremento en comparación con el tratamiento control, siendo el valor más alto el tratamiento de 60 mg L⁻¹, lo que indica una posible activación de la defensa antioxidante en respuesta al tratamiento aplicado.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la expresión de SOD entre los tratamientos. Esto indica que la expresión de SOD se mantiene relativamente estable bajo las condiciones evaluadas. Aunque el estrés o tratamiento aplicado pudo haber activado otros sistemas antioxidantes, SOD no presentó una respuesta diferencial, indicando que esta enzima podría no ser la principal involucrada en la defensa antioxidante en estas condiciones experimentales.

De manera similar a lo observado en plántulas de arroz bajo estrés por enfriamiento, donde la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de zinc mitigó el daño oxidativo al incrementar la actividad y la expresión génica de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) (Song *et al.*, 2021), en nuestro estudio se evidenció que las

NPs-ZnO promovieron una sobreexpresión significativa del gen CAT y POD en lechuga, lo que sugiere que este mecanismo constituye una estrategia de defensa generalizada de las plantas frente a condiciones de estrés abiótico.

Por último, la secuenciación de los amplicones correspondientes a *LsCAT*, *LsPOD* y *LsSOD* corroboró la identidad de los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR. Los análisis de alineamiento mostraron coberturas de consulta y porcentajes de identidad de entre 97–98% respecto a las secuencias depositadas en bases de datos públicas (BLAST) para estos genes en *Lactuca sativa*.

4.6 Conclusiones

La aplicación foliar de NPs-ZnO en *Lactuca sativa* generó respuestas fisiológicas, bioquímicas y nutricionales diferenciadas dependiendo de la concentración aplicada.

Las concentraciones intermedias (50–60 mg L⁻¹) promovieron un aumento significativo en la biomasa fresca y seca, así como en el contenido total de proteínas, lo que sugiere una mejora en el metabolismo general de la planta.

A nivel antioxidante, se observó una activación clara del sistema enzimático, particularmente en las actividades de catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), lo cual refleja un mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo inducido por las nanopartículas. En contraste, la actividad de polifenoloxidasas (PPO) no mostró cambios significativos, lo que indica una participación limitada de esta enzima en el contexto experimental. La amplificación específica y consistente de estos transcritos demostró que la exposición a NPs-ZnO regula de manera diferencial la actividad transcripcional de enzimas antioxidantes, consolidando la evidencia de un mecanismo de defensa molecular complementario a las respuestas fisiológicas observadas.

Además, el contenido de zinc en los tejidos vegetales se incrementó significativamente con la dosis de 50 mg L⁻¹, evidenciando una absorción eficiente y una posible mejora en la nutrición mineral. En conjunto, estos resultados destacan el potencial de las NPs-ZnO como bioestimulantes y agentes de biofortificación en cultivos hortícolas, siempre que se apliquen en concentraciones adecuadas que maximicen los beneficios fisiológicos sin inducir toxicidad.

4.7 Literatura citada

- Aebi HE (1983). Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer HU (Ed). Verlag Chemie Weinheim. pp 273- 286.
- Ahmed, R., Quddus, M. A., Uddin, M. K., Kasim, S. B., bin MohdYusoff, K. H., Hossain, M. M., ... & Haque, A. N. A. (2024). Influence of Zinc Oxide Nanoparticles on the Productivity, Mineral Element Accumulation, and Fruit Quality of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 12(6): 887-904. [https://doi.org/10.18006/2024.12\(6\).887.904](https://doi.org/10.18006/2024.12(6).887.904)
- Al Jabri, H., Saleem, M. H., Rizwan, M., Hussain, I., Usman, K., & Alsafran, M. (2022). Zinc oxide nanoparticles and their biosynthesis: overview. *Life*, 12(4), 594. <https://doi.org/10.3390/life12040594>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Desoky, E. S. M., Babalghith, A. O., & AbuQamar, S. F. (2022). Role of nanoparticles in enhancing crop tolerance to abiotic stress: A comprehensive review. *Frontiers in plant science*, 13: 946717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.946717>
- Elsherif, D. E., Abd-ElShafy, E., & Khalifa, A. M. (2023). Impacts of ZnO as a nanofertilizer on fenugreek: some biochemical parameters and SCoT analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1): 52. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00501-0>
- Fortis-Hernández, M., Claudia, V., Galindo-Guzmán, M., Preciado-Rangel, P., Galindo-Guzmán, A. P., & Flores-Loyola, E. (2023). Biofortification with ZnO NPs as nanofertilizers to improve sustainable commercial and phytochemical quality in basil plants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 51(2): 13078-13078. <https://doi.org/10.15835/nbha51213078>

- Galindo-Guzmán, A. P., Fortis-Hernández, M., De La Rosa-Reta, C. V., Zermeño-González, H. & Galindo-Guzmán, M. (2022). Síntesis química de nanopartículas de óxido de zinc y su evaluación en plántulas de *Lactuca sativa*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (28): 299-308. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3284>
- Garza-Alonso, C. A., Juárez-Maldonado, A., González-Morales, S., Cabrera-De la Fuente, M., Cadenas-Pliego, G., Morales-Díaz, A. B., & Benavides-Mendoza, A. (2023). ZnO nanoparticles as potential fertilizer and biostimulant for lettuce. *Heliyon*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12787>
- Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3): 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>
- Hasan, M., Tariq, T., Mustafa, G., Ismail, E. A., Awwad, F. A., & Hatami, M. (2024). Biogenic zinc oxide nanoregulator determines the quantitative analysis of morpho-anatomical and antioxidant capacity in *Lactuca sativa* L. *Food Science & Nutrition*, 12(10): 7954-7967. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4261>
- Hidalgo, A., Šaponjac, V. T., Četković, G., Šeregelj, V., Čanadanović-Brunet, J., Chiosa, D. & Brandolini, A. (2019). Antioxidant properties and heat damage of water biscuits enriched with sprouted wheat and barley. *Lwt*, 114: 108423. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108423>
- Hong, J., Wang, C., Wagner, D. C., Gardea-Torresdey, J. L., He, F., & Rico, C. M. (2021). Foliar application of nanoparticles: mechanisms of absorption, transfer, and multiple impacts. *Environmental Science: Nano*, 8(5): 1196-1210.
- Hsu, C. L., Chen, W., Weng, Y. M. & Tseng, C. Y. (2003). Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry* 83(1): 85-92. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00053-0)
- J.I. García-López, G. Niño-Medina, E. Olivares-Saenz, R.H. Lira-Saldivar, E.D. Barriga-Castro, R. Vázquez-Alvarado, P.A. Rodríguez-Salinas & F. Zavala-García. (2019). Foliar application of

zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate boosts the content of bioactive compounds in habanero peppers, *Plants* 8 (8): 254. <https://doi.org/10.3390/plants8080254>

Kalaji, H. M., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., & Goltsev, V. (2014). Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant physiology and biochemistry*, 81: 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.029>

Lichtenthaler, H. K. & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 11(5): 591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>

Mathur, S., Pareek, S., & Shrivastava, D. (2022). Nanofertilizers for development of sustainable agriculture. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 53(16): 1999-2016. <https://doi.org/10.1080/00103624.2022.2070191>

Mosa, K. A., El-Naggar, M., Ramamoorthy, K., Alawadhi, H., Elnaggar, A., Wartanian, S., & Hani, H. (2018). Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Frontiers in plant science*, 9: 872. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00872>

Noulas, C., Tziouvalekas, M., & Karyotis, T. (2018). Zinc in soils, water and food crops. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 49, 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.02.009>

Oktay M, Küfrevioğlu I, Kocaçalışkan I, Şakiroğlu H (1995). Polyphenoloxidase from Amasya apple. *Journal of Food Science* 60(3): 494-496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09810.x>

Onsa GH, Saari N, Selamat J, Bakar J. (2004). Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry* 85: 365-376. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2003.07.013>

Padayatt, S., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, PK., Song, J., Koh, W. S. & Levine, M. (2001). Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. In: Cadenzas E, Packer L (Eds). *Handbook of Antioxidants*. CRC press. Washington DC, USA pp 117-145

- Peppi, M.C. (2004). Color development studies in table grapes. Univ. Calif., Davis, MS Thesis.
- Preciado-Rangel, P., Sánchez-Chávez, E., Fortis-Hernández, M., Gaucin-Delgado, J. M., Avalos, R. G., Hermosillo-Alba, M. C., & Guillén-Enríquez, R. R. (2024). Enhanced enzymatic and bioactive compounds in lettuce via zinc oxide nanoparticles. *Notulae Scientia Biologicae*, 16(4): 12088-12088. <https://doi.org/10.55779/nsb16412088>
- Rani, S., Kumar, P., Dahiya, P., Dang, A. S., & Suneja, P. (2022). Biogenic synthesis of zinc nanoparticles, their applications, and toxicity prospects. *Frontiers in microbiology*, 13: 824427. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824427>
- Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S., & Brestic, M. (2017). Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in chemistry*, 5: 78. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00078>
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., & Devi, R. (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism (s) of action. *Frontiers in pharmacology*, 13: 806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299(7): 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Song, Y., Jiang, M., Zhang, H., & Li, R. (2021). Zinc oxide nanoparticles alleviate chilling stress in rice (*Oryza sativa* L.) by regulating antioxidative system and chilling response transcription factors. *Molecules*, 26(8): 2196. <https://doi.org/10.3390/molecules26082196>
- Stanton, C., Sanders, D., Krämer, U., & Podar, D. (2022). Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification. *Molecular Plant*, 15(1): 65-85. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.008>
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil*, 15(2): 134-154.

- Tiwari, S., Patel, A., Yadav, V., Khandelwal, A., Singh, R. P., Arya, D., & Prasad, S. M. (2025). Nanotechnology in agriculture: enhancing crop productivity and addressing toxicity in plants and algae. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 10(2): 32. <https://doi.org/10.1007/s41204-025-00428-6>
- Tripathi, D. K., Tripathi, A., Shweta, Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., & Chauhan, D. K. (2017). Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: a concentric review. *Frontiers in microbiology*, 8: 07. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00007>
- Umair Hassan, M., Huang, G., Haider, F. U., Khan, T. A., Noor, M. A., Luo, F., & Iqbal, M. M. (2024). Application of zinc oxide nanoparticles to mitigate cadmium toxicity: Mechanisms and future prospects. *Plants*, 13(12): 1706. <https://doi.org/10.3390/plants13121706>
- Xu L., Yue Q., Xiang G., Bian F. & Yao Y. (2017). Melatonin promotes ripening of grape berry via increasing the levels of ABA, H₂O₂, and particularly ethylene. *Horticulturae research*. 5:41. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0045-y>

ANEXO A

INICIO / ARCHIVOS / NÚM. 28 (2022): ESPECIAL / Artículos

Síntesis química de nanopartículas de óxido de zinc y su evaluación en plántulas de *Lactuca sativa*

Alma Patricia Galindo-Guzmán

Doctorado en Ciencias en Agua y Suelo-Tecnológico Nacional de México-
Campus Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km
7.5, ejido Ana, Torreón, Coahuila, México. CP. 27170

Manuel Fortis-Hernández

Doctorado en Ciencias en Agua y Suelo-Tecnológico Nacional de México-
Campus Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km
7.5, ejido Ana, Torreón, Coahuila, México. CP. 27170

Claudia Verónica De La Rosa-Reta

Doctorado en Ciencias en Agua y Suelo-Tecnológico Nacional de México-
Campus Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km
7.5, ejido Ana, Torreón, Coahuila, México. CP. 27170

Héctor Zermeno-González

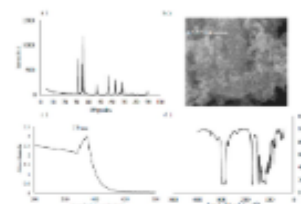
Doctorado en Ciencias en Agua y Suelo-Tecnológico Nacional de México-
Campus Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km
7.5, ejido Ana, Torreón, Coahuila, México. CP. 27170

Magdalena Galindo-Guzmán

Universidad Politécnica de la Región Laguna. Calle sin nombre, sin número,
ejido Santa Teresa, San Pedro de las Colonias, Coahuila, México. CP. 27942

DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3284>

Palabras clave: *Lactuca sativa*, nanotecnología, toxicidad



XML

XML (ENGLISH)

HTML

HTML (ENGLISH)

PDF

PDF (ENGLISH)

PUBLICADO

2022-09-22

CÓMO CITAR

Galindo-Guzmán, Alma Patricia,
Manuel Fortis-Hernández, Claudia
Verónica De La Rosa-Reta, Héctor
Zermeno-González

ANEXO B

ZnO nanoparticles synthesized by chemical precipitation to increase germination and bioactive compounds in sprouts of *Raphanus sativus* L.

Galindo-Guzmán, Magdalena¹; Fortis-Hernández, Manuel²; Preciado-Rangel, Pablo²; Galindo-Guzmán, Alma P.^{2*}

¹ Universidad Politécnica de la Región Laguna, Calle sin nombre, sin número, ejido Santa Teresa, San Pedro de las Colonias, Coahuila, México, C.P. 27942.

² Tecnológico Nacional de México-Campus Instituto Tecnológico de Torreón, Antigua carretera Torreón-San Pedro km 7.5, Torreón, Coahuila, México, C.P. 27170.

* Correspondence: galiindo@live.com

ABSTRACT

Objective: To examine how priming radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts with zinc oxide nanoparticles (NPs-ZnO) affects their germination, photosynthetic pigments, phenolic compounds, and zinc content.

Design/methodology/approach: We evaluated five NPs-ZnO treatments and a control sample with four replications under a completely randomized design.

Results: Sprouts treated with NPs-ZnO showed increased germination variables, photosynthetic pigments, phenolic compounds, and zinc content as compared to untreated radish sprouts.

Study limitations/implications: It is hard to establish a response model for the effects of NPs since their shape, size, surface charge, chemical composition, and concentration may have a differentiated impact on seed germination.

Findings/conclusions: Using NPs-ZnO could be an effective way to enrich crops, since the passage of Zn through plant tissues will cause an accumulation of this micronutrient.

Keywords: *Raphanus sativus*, Nanofertilizer, Zinc oxide.

Citation: Galindo-Guzmán, M., Fortis-Hernández, M., Preciado-Rangel, P., Galindo-Guzmán, A. P. (2023). ZnO nanoparticles synthesized by chemical precipitation to increase germination and bioactive compounds in sprouts of *Raphanus sativus* L. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v16i2.2414>

Academic Editors: Jorge Cadena