

Efecto de nanopartículas biosintetizadas mediante extractos vegetales en el crecimiento y desarrollo de plantas de interés agrícola: adición de de AgCl/Ag a *Latuca sativa*

Effect of biosynthesized nanoparticles by plant extracts on the growth and development of plants of agricultural interest: addition of AgCl/Ag to *Latuca sativa*

YAÑEZ-CRUZ, María Guadalupe†, VILLANUEVA-IBÁÑEZ, Maricela*, ÁLVAREZ-GARCÍA, Rocío, FLORES-GONZÁLEZ, Marco Antonio y TOVAR-JIMENEZ, Xochitl

Universidad Politécnica de Pachuca, Laboratorio de Nanotecnología, Sistemas Biológicos y Aplicaciones Industriales

ID 1^{er} Autor: *María Guadalupe, Yañez-Cruz* / **ORC ID:** 0000-0002-0124-0300, **Researcher ID Thomson:** V-4798-2018, **CVU CONACYT ID:** 638837

ID 1^{er} Coautor: *Maricela, Villanueva-Ibáñez* / **ORC ID:** 0000-0003-3209-8340, **Researcher ID Thomson:** V-4121-2018, **CVU CONACYT ID:** 38497

ID 2^{do} Coautor: *Rocío, Álvarez-García* / **ORC ID:** 0000-0001-7573-3290, **Researcher ID Thomson:** V-4112-2018, **CVU CONACYT ID:** 201058

ID 3^{er} Coautor: *Marco Antonio, Flores-González* / **ORC ID:** 0000-0002-5116-5003, **Researcher ID Thomson:** V-4622-2018, **CVU CONACYT ID:** 201498

ID 3^{er} Coautor: *Xochitl, Tovar-Jimenez* / **ORC ID:** 0000-0002-6626-6237, **Researcher ID Thomson:** V-4155-2018, **CVU CONACYT ID:** 63558

M. Yañez, M. Villanueva, R. Álvarez, M. Flores y X. Tovar

*villanueva@upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

The field of nanotechnology is leading to a rapid propagation of nanomaterials to the environment due to the new or improved properties such as size, distribution and morphology, however their possible impacts are still not completely known. The silver-based nanoparticles (NPs) are one of the most frequently silver materials used in products for human consumption, due to their antimicrobial properties. Biosynthesis of silver nanoparticles has received considerable attention because avoids the use of toxic precursors, it has also been observed that when silver chloride NPs (AgCl) are synthesized, a silver phase (Ag) is obtained, which can lead to an improvement of its antimicrobial properties, and therefore, the potential release of NPs to the environment. It is important understand the interaction with biological systems, where plants play an important role because they are an essential component in all ecosystems. It has been reported that NPs can be absorbed by the roots and transported to different tissues of the seedlings, the impact they cause depends on their physicochemical properties, such as concentration, size, chemistry and morphology, to name a few. For this reason and due to the few studies of this type, this work presents the effect that biosynthesized NPs have on plants, particularly the effect of AgCl / Ag NPs obtained from an aqueous extract when they are added to *Lactuca sativa*. In this way, the effects on the growth and development of the plant, through *in vivo* and *in vitro* tests, are reported in this work. The acute phytotoxic effects were evaluated as percentage of germination, elongation of the root and hypocotyl, biomass, length and width of the leaves as well as content of chlorophyll a, b and c.

Biosíntesis, nanopartículas, cloruro de plata, *L. sativa*

1. Introducción

El desarrollo de la nanotecnología en la fabricación de nuevos nanomateriales es cada vez mayor, debido a las propiedades nuevas y mejoradas que presentan respecto a sus materiales *bulk*. Dentro de los nanomateriales que se desarrollan actualmente, destacan las nanopartículas (NPs) a base de plata y recientemente las de cloruro de plata (AgCl NPs) por ser cada vez más empleadas en productos de consumo humano, dadas sus propiedades antimicrobianas (Trinh, Nguyen, & Nguyen, 2015), por ejemplo, en la elaboración de productos textiles, como agente antimicrobiano en desodorantes, vendajes, agentes cicatrizantes, instrumentos quirúrgicos, catéteres o prótesis de huesos, detergentes, purificadores de agua o pinturas, así como líquidos antimicrobianos, en recubrimiento de frutos para prolongar su conservación, para la fabricación de materiales que están en contacto con los alimentos, etc.

La síntesis de NPs por métodos biológicos destaca por ser un proceso de obtención que no hace uso de precursores tóxicos, en su lugar se emplean microorganismos como bacterias, levaduras y hongos, así como extractos de plantas, para la reducción de iones metálicos (Sahayaraj & Rajesh, 2015), en este sentido, el uso de plantas puede ser ventajoso sobre otros procesos biológicos ya que se evita el elaborado proceso del mantenimiento de cultivos celulares (Kuppusamy, Yusoff, Maniam, & Govindan, 2016). Se ha observado que las AgCl NPs provenientes de este tipo de métodos, presentan además una porción no determinada de Ag NPs, lo que podría mejorar sus propiedades antimicrobianas dando lugar a la liberación no intencional en nuestro entorno.

A pesar de los enormes beneficios que brindan las NPs en diferentes sectores de la industria, es inevitable la liberación de estas al ambiente a través de su transporte, uso y eliminación, lo que constituye un grave problema que debe ser abordado inmediatamente. Dentro de los escasos estudios que se han realizado sobre el impacto de las NPs en cultivos vegetales, la gran mayoría han obtenido los nanomateriales por síntesis química, encontrando efectos tanto benéficos como adversos en el crecimiento y desarrollo de semillas de diferentes especies vegetales. Oliveira et al. (2004) reportan el efecto de Ag NPs en forma coloidal, en polvo y en solución con tamaños de 2-20, 20 y 5 nm, respectivamente, sobre *Lolium*, *Hordeum vulgare* y *Linum usitatissimum*, donde las partículas mostraron efectos inhibitorios en la elongación de tallo y raíz con tan sólo 10 mg/L; Lee, Kwak, & An (2012), evaluaron el efecto de Ag NPs recubiertas de citrato, en estado coloidal con tamaños de partícula de 5-25 nm, sobre *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor*, los resultados mostraron la reducción del crecimiento de las plántulas y signos de necrosis dependientes de la concentración de NPs. Por otro lado Iram et al. (2014), reportaron efectos estimulantes en el crecimiento de raíz de *Raphanus sativus* L. al aplicar 13.5 µg/mL de Ag NPs, sin embargo, este efecto era dependiente de la concentración, ya que al aumentar la dosis a 27 µg/mL, mostraba inhibición en la elongación de la raíz.

Recientemente los estudios sobre los efectos de NPs se han enfocado también en aquellas provenientes de biosíntesis, ya que se asumía que los efectos tóxicos inducidos por las NPs provenientes de métodos químicos estaban asociados a los compuestos tóxicos adsorbidos en la superficie de los nanomateriales; sin embargo, diversos estudios demuestran que las características fisicoquímicas de las NPs son las que están directamente relacionadas con la actividad biológica y su comportamiento en el medio. El tamaño y concentración de las NPs son algunos de los puntos críticos que determinan su toxicidad (Auffan, Rose, Wiesner, & Bottero, 2009). En la tabla 4.1 se muestra un compendio de trabajos relacionados con el efecto de nanopartículas obtenidas por biosíntesis en cultivos de interés agrícola.

Tabla 4.1 Estudios del efecto de nanopartículas obtenidas por biosíntesis sobre cultivos vegetales de interés

Nanopartícula (tamaño y dosis aplicada)	Planta en estudio	Efectos	Referencia
Au 20-50 nm 1.96-196 mg/L	<i>Allium cepa</i>	No mostró efectos carcinogénicos ni citotóxicos. Estimuló el índice mitótico y la germinación de polen conforme aumentaba la concentración de NPs.	(Gopinath, Venkatesh, Ilangovan, Sankaranarayanan, & Arumugam, 2013)
CaCO ₃ 40-75 nm 3336 mg/L	<i>Vigna mungo</i> (L.). Hepper	El mayor % de germinación, elongación de plántulas y biomasa se obtuvo al adicionar las NPs biosintetizadas, en comparación con el control (CaCl ₂) y el blanco (agua destilada).	(Yugandhar & Savithramma, 2016)
Au ~15.9 nm 5000-20 000	<i>Vigna radiata</i> L.	Completa inhibición de la germinación de semillas a partir de 15 000 mg/L con las NPs y el extracto empleado para la síntesis. El efecto inhibitorio puede relacionarse a los metabolitos presentes en el extracto, como alcoholes, aldehídos, cetonas y lactonas.	(Garg & Malik, 2014)
Ag ~ 13 nm 20 y 50 mg/L	<i>Pennisetum glaucum</i>	El % de germinación se vio favorecido al aumentar la dosis de NPs aplicada. A partir de 20 mg/L, disminuyó la elongación de raíz y tallo, los autores proponen que pudo ser debido a que las NPs se adhieren a las raíces de las plantas y ejercen toxicidad física o química en las plantas.	(Parveen & Rao, 2014)
MgO 25 y 27 nm Concentración no especificada	<i>Cicer arietinum</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	El tiempo de contacto de las NPs con <i>C. arietinum</i> favoreció el % de germinación, contenido de clorofila y carotenoides, respecto al control. Mientras que <i>S. lycopersicum</i> mostró un decremento significativo incluso al someter la semillas solamente durante 2h con NPs.	(Moorthy, Ashok, Rao, & Viswanathan, 2015)
Ag ~17 nm 100 mg/L	<i>Triticum aestivum</i> L. <i>Solanum lycopersicum</i> L.	En la germinación <i>T. aestivum</i> tuvo un incremento en la longitud de las plántulas, y los pigmentos fotosintéticos respecto al control. Mientras que en la etapa vegetativa, se observó un decremento en el contenido de biomasa, elongación de raíz y tallo. Para <i>S. lycopersicum</i> , el contenido de clorofila y carotenoides aumentó y con ello, la acumulación de proteínas solubles.	(Farghaly & Nafady, 2015)
Ag ~20 nm 0.1-50 mg/L	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	10 ppm de NPs promovieron el % de germinación en comparación con el control. Contenido de biomasa, elongación de radícula y tallo mostraron efectos negativos al adicionar 50 ppm. Se observó una menor bioacumulación de NPs por irrigación que por aspersión foliar.	(Malathi & Palani, 2016)
ZnO ~16 nm 0-500 mg/L	<i>Solanum lycopersicum</i>	Efecto dependiente de la concentración de NPs aplicadas. 100 mg/L mostraron un aumento en el % de germinación, crecimiento de plántulas e índice de vigor. El contenido de clorofila, proteína y azúcar incrementa significativamente con la concentración más baja.	(Singh et al., 2016)
ZnO ~20 nm 0-150 mg/L	<i>Vigna radiata</i> L.	Se promovió el % de germinación y el crecimiento de plántulas de <i>V. radiata</i> Las NPs pueden penetrar el recubrimiento de la semilla y estimular las hormonas del crecimiento específicamente el ácido indolacético, el cual además interviene en el proceso de absorción de agua.	(Jayarambabu & Rao, 2016)
Au ~39 nm 0-2000 mg/L	<i>Oryza sativa</i>	No se muestran efectos significativos en los parámetros evaluados: elongación de raíz, muerte celular, formación de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica.	(Ndeh, Maensiri, & Maensiri, 2017)
Ag ~30 nm 0-80 mg/L Ag NPs comerciales funcionalizadas con citrato ~20 nm	<i>Triticum aestivum</i> <i>Phaseolus mungo</i>	No se detectan efectos significativos en el % de germinación para ninguna de las especies en estudio. Se observaron efectos fitotóxicos en la elongación de raíz y tallo por encima de 60 mg/L. Los autores sugieren que 30 mg/L pueden ser apropiados para el desarrollo de aplicaciones comerciales en el tratamiento de semillas y control de fitopatógenos.	(Kim et al., 2017)
Ag 1-16 nm 0-900 mg/L	<i>Lupinus termis</i> L.	El % de germinación, así como el contenido de biomasa, elongación de radícula e hipocótilo se ven favorecidos al añadir 0.1 mg/L respecto al control, sin embargo, por encima de esta concentración hay una disminución en los parámetros de crecimiento, así como acumulación de prolina foliar.	(Al-huqail, Hatata, Al-huqail, & Ibrahim, 2017)
Au 20-30 nm 0-179 mg/L	<i>Allium cepa</i> <i>Gloriosa superba</i>	No mostraron algún tipo de toxicidad. La adición de Au NPs promueve la división mitótica celular (87%), así mismo, la germinación de polen se ve favorecida hasta un 98.66%.	(Balalakshmi et al., 2017)
AgCl/Ag 30-50 nm 0.013-130 mg/L	<i>Latuca sativa</i> L. <i>var. longifolia</i>	Los efectos fitotóxicos de las NPs son dependientes de la concentración aplicada. 0.013 ppm estimulan el % de germinación elongación de hipocótilo y biomasa. A partir de 1.3 ppm se observaron efectos adversos sobre las características fisiológicas de las plántulas, que impiden su posterior desarrollo y crecimiento.	(Yañez Cruz et al., 2017)
Ag 0-100 mg/L	<i>Triticum aestivum</i>	Las NPs aplicadas promovieron el % de germinación, crecimiento de radícula, hipocótilo y contenido de biomasa respecto al control. El efecto estimulante de las NPs se ve favorecido al incrementar la concentración de NPs.	(Sabir, Arshad, Satti, & R, 2018)

Como se puede apreciar en la tabla 4.1, la información disponible sobre los nanomateriales biosintetizados y su efecto en cultivos vegetales se encuentra en pleno desarrollo, aún no del todo explicada y en principio sugiere que es baja la repercusión de esas nanopartículas en los cultivos vegetales; sin embargo, es también evidente que la concentración de NPs aplicada es determinante, por esta razón, un mejor entendimiento de las interacciones entre las NPs y los sistemas biológicos es de suma importancia para evaluar su efecto y posible transporte trófico. Este trabajo tiene como objetivo poner en evidencia los efectos que presenta la adición de diferentes concentraciones de NPs de Ag/AgCl provenientes de una síntesis biológica sobre el crecimiento y desarrollo de un cultivo hortícola de importancia a nivel mundial (*L. sativa* L. var. *longifolia*) mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

2. Materiales y métodos

2.1 Síntesis y caracterización de AgCl/Ag NPs

Se emplearon AgCl/Ag NPs sintetizadas a partir del protocolo propuesto por Villanueva-Ibáñez, Yañez-Cruz, Álvarez-García, Hernández-Pérez, & Flores-González (2015), que se obtienen adicionando a dos viales diferentes 3 mL y 5 mL de los extractos de la perfolia de *Zea mays* preparados por decocción y molienda respectivamente, 10 mL de una solución de AgNO₃ 5 mM, ajustando el volumen final a una concentración de 2 mM con agua desionizada, que se mantienen a 25° C y agitación constante durante 4 h, posteriormente se realizó una separación de las partículas mediante centrifugación a 8 000 rpm durante 15 min, donde se retiró el sobrenadante y se realizaron lavados al precipitado por triplicado, la acumulación de estos precipitados se re-dispersó en agua desionizada en el volumen inicial y se empleó para los análisis posteriores. Se emplearon técnicas complementarias para conocer la morfología, tamaño, estructura cristalina y concentración de las partículas a emplear en los ensayos de toxicidad.

2.2 Análisis de viabilidad de las semillas

Las semillas fueron adquiridas en *Hydro Enviroment*, evaluando en primer lugar la viabilidad mediante el método de germinación sobre papel y la prueba de tetrazolio, recomendados por las normas ISTA (Ellis, Hong, & Roberts, 1985). El número de semillas empleado fue de 400 para ambas pruebas, las condiciones para la prueba de germinación sobre papel fueron siete días en cajas Petri de vidrio estériles, 20°C, 1500 lux de iluminación, papel filtro Whatman no. 40 como soporte. Las semillas fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos y se enjuagaron varias veces con agua desionizada hasta eliminar el exceso. Para la prueba de tetrazolio se empleó una solución de la sal al 0.5 % en la cual se sumergieron durante 24 h a 30 °C en oscuridad, transcurrido el tiempo se evaluaron respecto a la coloración obtenida.

2.3 Ensayos de toxicidad *in vitro*

2.3.1 Prueba preliminar de toxicidad

Se realizó una prueba preliminar, según lo recomienda la USEPA (Greene, Bartels, Warren-Hicks, Parkhurst, & Linder, 1988), para el caso de sustancias cuya toxicidad es desconocida, empleando diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1, 0.01) que permitieron establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0%. Las diluciones de las NPs se prepararon con agua desionizada. Para el experimento se colocó en cada caja Petri estéril un disco de papel filtro Whatman No. 40 y se adicionaron 9 mL de cada solución a ensayar, con ayuda de unas pinzas rectas se colocaron 30 semillas en cada caja dejando un espacio de dos a tres veces su diámetro de manera que permitiera la elongación de las raíces. Se emplearon como controles positivos la sal precursora de AgNO₃ y controles negativos con agua desionizada y extracto a las mismas diluciones que las NPs, con tres repeticiones para cada tratamiento (90 unidades experimentales), se incubaron en una cámara de germinación durante 7 días a 20 ± 2°C con 1500 lux de iluminación.

2.3.2 Prueba de exposición de las semillas por inmersión

Esta prueba se realizó con base a los estudios realizados por Song et al. (2013) con la finalidad de evaluar la recuperación de las plántulas de *L. sativa* transcurridas 48 h de exposición a diferentes concentraciones de AgCl/Ag NPs, la elección de las concentraciones se llevó a cabo a partir del análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar, eligiendo aquellas que causaron un efecto significativo en las características fisiológicas de las plántulas.

Para la evaluación de la toxicidad, se pusieron en contacto 20 mL de cada una de las soluciones con sus respectivos controles, empleando 60 unidades experimentales distribuidas en 3 frascos con 20 semillas cada uno, se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente durante 48 h. Al finalizar ambas pruebas *in vitro* se evaluaron los efectos fitotóxicos agudos como el porcentaje de germinación, elongación de radícula e hipocótilo, peso húmedo y seco.

2.4 Ensayos de toxicidad *in vivo*

Este ensayo fue realizado en dos etapas sucesivas: Prueba de toxicidad aguda con una duración de 4 semanas y posterior a su trasplante la toxicidad subcrónica de 6 semanas.

2.4.1 Etapa 1: Prueba de toxicidad aguda (4 semanas)

Como se reporta en la literatura, la toxicidad, bioacumulación y disolución de las NPs está directamente influenciada por el medio de exposición, por lo que se retomaron las concentraciones empleadas en el ensayo preliminar (0.013, 1.3, 13 ppm precipitado y sobrenadante) para realizar el estudio *in vivo*, con el suelo artificial, excepto la concentración más alta pues no dio lugar a la obtención de plántulas con las estructuras esenciales que permitieran su posterior desarrollo.

El sustrato empleado fue la mezcla *Sunhine No. 3* compuesta por una combinación uniforme de musgo, *Sphagnum Canadiense* y vermiculita, se preparó mezclándolo y humedeciéndolo con agua desionizada hasta quedar saturado, posteriormente se adicionaron 64 g del sustrato a cada maceta, colocando una semilla a 1 cm de profundidad, cada tratamiento se realizó por triplicado. La prueba se llevó a cabo en condiciones naturales de luz e iluminación en invernadero, durante cuatro semanas, el riego de NPs se realizó cada tercer día adicionando gota a gota 0.5 mL de cada tratamiento empleado alrededor del tallo de la plántula, el nivel de humedad del sustrato se revisó diariamente el cual con ayuda de un aspersor era humedecido con agua desionizada durante las primeras tres semanas, en la cuarta semana se adicionó al agua la solución nutritiva *Hoagland* para hortalizas, proporcionada por los proveedores de *Hydro Enviroment* con un contenido del 10% de Nitrógeno (N), 8% Fósforo (P) y 18% Potasio (K). Luego del periodo de exposición aguda un porcentaje de las plántulas de cada tratamiento fue empleado para medir los efectos fitotóxicos y el resto se utilizó para continuar con la prueba de toxicidad subcrónica.

2.4.2 Etapa 2: Prueba de toxicidad subcrónica (6 semanas)

Las plántulas previamente expuestas en el ensayo de exposición aguda (30 días) se trasplantaron a macetas más grandes y continuaron su crecimiento durante 6 semanas más en diferentes ambientes:

a) En sustrato

Se realizó el trasplante a macetas de 11.5 cm de profundidad x 13 cm de ancho, conteniendo 400 g de sustrato preparado como se describió anteriormente. Las concentraciones ensayadas fueron las mismas que en el ensayo de toxicidad aguda: 0, 0.013, 1.3, y 13 ppm esta última de sobrenadante y de precipitado. Cada tratamiento se realizó por triplicado, bajo condiciones naturales de luz e iluminación en invernadero. El nivel de humedad se revisó diariamente, y se mantuvo con solución nutritiva *Hoagland*. La adición de NPs se siguió efectuando cada tercer día gota a gota con 0.5 mL de NPs de cada concentración empleada alrededor del tallo.

b) En hidroponia

Se realizó el trasplante a un sistema de hidroponia de raíz flotante, por ser de los más recomendados para este tipo de hortalizas. En este caso solo se seleccionó como concentración más alta el punto que ocasionó un efecto significativo según el análisis estadístico realizado, 1.3 ppm, y la concentración más baja a la que no se observó efecto significativo en las características fisiológicas de las plántulas, 0.013 ppm; además del blanco, 0 ppm. Para ello se prepararon 10 L de cada concentración, empleando solución nutritiva *Hoagland* y agua desionizada, los contenedores a los que se les adicionaron las NPs con la solución nutritiva se mantuvieron protegidos de la luz para evitar crecimiento de hongos. El sistema contó con un *timer* al que se le programó la recirculación de la solución durante 10 minutos cada 2 horas, como lo recomienda el proveedor.

2.4.3 Evaluación de la adición de NPs a plántulas de *L. sativa* después de 4 semanas de crecimiento

a) Prueba de exposición directa al tallo

Para realizar este ensayo se trasplantaron plántulas que durante las primeras 4 semanas no habían sido expuestas a NPs, en macetas de 11.5 cm de profundidad x 13 cm de ancho, conteniendo 400 g de sustrato preparado como se describió anteriormente, para adicionar a partir de este momento alrededor del tallo de la plántula, 0.5 mL de NPs cada tercer día. El nivel de humedad se revisó diariamente y el riego se realizó con la solución nutritiva *Hoagland*. La duración de la prueba fue de 6 semanas, cada tratamiento se realizó por triplicado.

b) Prueba de exposición foliar

El trasplante se realizó como se describió en la prueba directa en sustrato, con la diferencia de que la adición de las NPs se llevó a cabo con ayuda de un aspersor directo sobre las hojas, se verificó que con una aplicación se añadían 0.5 mL de cada tratamiento. Al finalizar todas las pruebas de toxicidad *in vivo* se evaluó número de hojas, largo y ancho de hojas, elongación de la raíz y tallo, peso seco y húmedo, así como contenido de clorofila *a*, *b*, y *c*.

2.5 Análisis de los datos

Todos los resultados se expresaron como el promedio de tres repeticiones realizadas para cada prueba. Los datos presentados se evaluaron con base a comparaciones con el control correspondiente en cada caso, mediante la prueba de Tukey, empleando el programa NCSS (Windows Vista, Versión 0.7.1.17, Kaysville, Utah), reportándose diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.001$.

3. Resultados

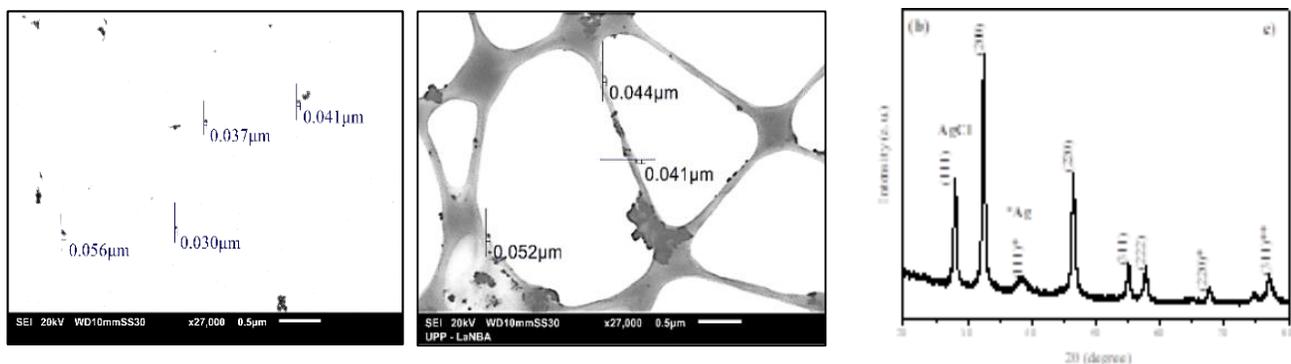
3.1 Caracterización de las AgCl/Ag NPs

La caracterización de las NPs obtenidas a partir de los extractos por infusión y decocción confirmó la formación de partículas semiesféricas de 144 nm y 487 nm respectivamente, estos aglomerados se encontraban conformados por partículas más pequeñas de 30-50 nm. Con el difractograma realizado se confirmó la presencia de ambas estructuras cristalinas Ag y AgCl, para ambos extractos, y mediante el análisis de absorción atómica se conoció la concentración de Ag que fue de 136.51 ppm. A partir de estos datos, se realizaron los ensayos de toxicidad que a continuación se mencionan.

3.2 Viabilidad de las semillas de *L. sativa*

El porcentaje de germinación obtenido con ambas pruebas fue de 60%, según lo establecido en las normas, se debe aumentar el número de semillas a evaluar en las pruebas subsecuentes a 30 semillas, para obtener al menos 18 semillas germinadas en cada caja y poderlas emplear para los estudios posteriores.

Figura 4.1 a) Micrografía de la síntesis de AgCl/Ag NPs a partir del extracto de la perfolia de *Zea mays* obtenido por infusión y b) por decocción; c) Difractograma de Ag y AgCl NPs obtenido para ambos extractos



a)

b)

c)

3.3 Ensayos de toxicidad *in vitro*

Los ensayos de toxicidad *in vitro* recomendados por Greene et al. (1988) tienen como objetivo evaluar los efectos fitotóxicos en los primeros días de crecimiento, ya que es durante esta etapa donde ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de una planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos.

Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta (Cecilia Sobrero & Ronco, 2008).

3.3.1 Prueba preliminar de toxicidad

Este ensayo permitió establecer el intervalo de concentración de NPs a utilizar en los estudios posteriores. Se partió de la concentración inicial de NPs que se tiene según los resultados obtenidos mediante absorción atómica. A partir del análisis ANOVA empleando la prueba de Tukey con una $p < 0.001$ se observó que el efecto en la fisiología de las plántulas está directamente relacionado con la concentración empleada, puesto que, para el hipocótilo, al adicionar 0.013 ppm presenta un efecto estimulante en la elongación, mientras que si esta concentración aumenta a 1.3 ppm su medida disminuye hasta un 50% respecto al control.

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas de todas las variables estudiadas (hipocótilo, radícula, peso húmedo y peso seco) respecto al control al adicionar 0.13 ppm de NPs obtenidas a partir del extracto por infusión.

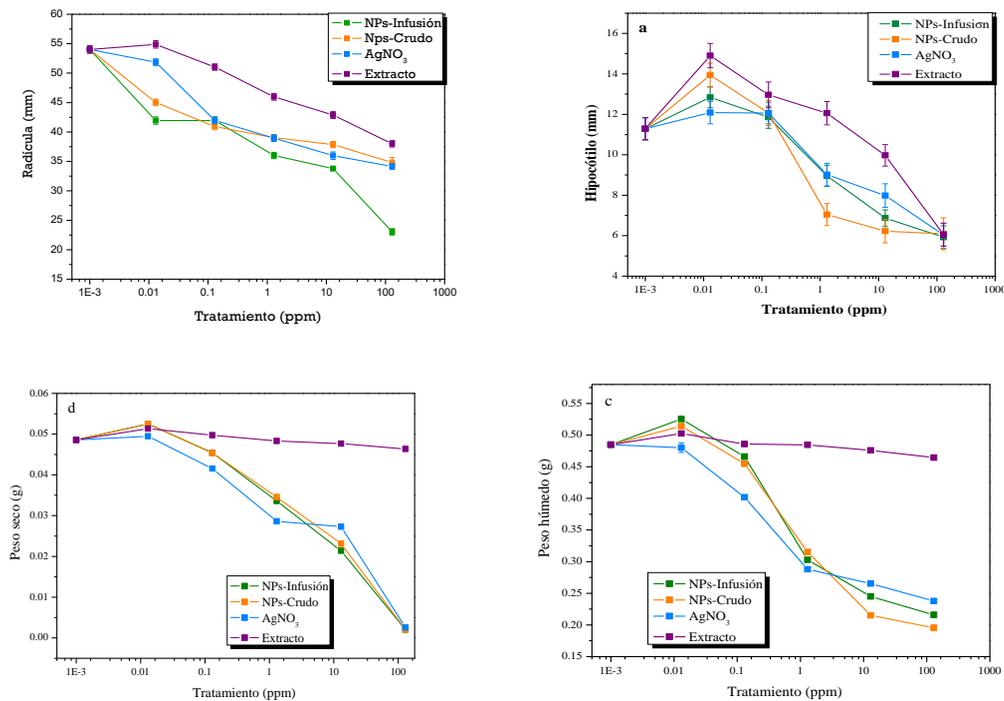
Así mismo, se observó que el tamaño de partícula influyó en la elongación de radícula principalmente, ya que ambas NPs biosintetizadas mostraron inhibición, pero el efecto fue mayor para las NPs obtenidas por infusión con tamaños de 144 nm que para las NPs obtenidas con tamaños de 486 nm.

Los controles, AgNO_3 y extracto, mostraron también un efecto dependiente de la concentración aplicada, siendo el hipocótilo a 1.3 ppm de ambos controles donde mostraron el mayor efecto, por otro lado, el extracto no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control en el contenido de biomasa con ninguna de las concentraciones aplicadas.

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba y con el análisis ANOVA, se eligieron las concentraciones que dan lugar a plántulas “normales”, es decir aquellas que posean todas sus estructuras esenciales (hipocótilo, cotiledón y radícula) y con diferencias estadísticamente significativas respecto al control, siendo a partir de 0.13 ppm de cada tratamiento.

3.3.2 Prueba de exposición de las semillas por inmersión

Figura 4.2 Prueba preliminar, para determinar el efecto en la elongación de a) Hipocótilo, b) Radícula, c) Peso húmedo y d) Peso seco sobre la germinación de semillas de *L. sativa* al ser expuestas a 0.013, 0.13, 1.3, 13 y 130 ppm de AgCl/Ag NPs durante siete días mediante un ensayo in vitro. Los datos corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo



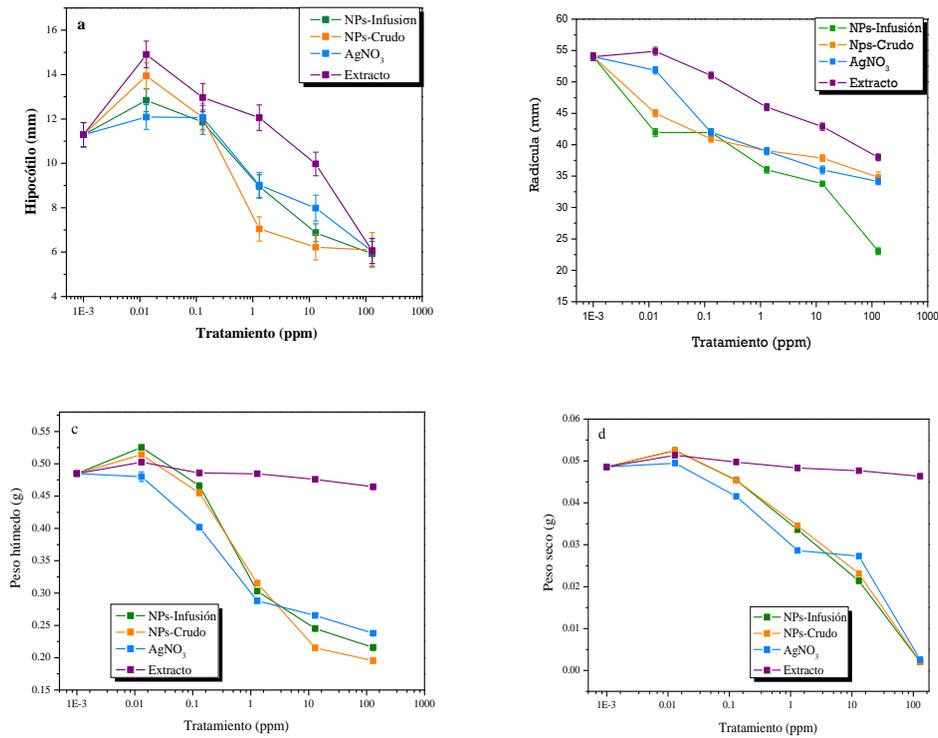
La elección de las concentraciones de los tratamientos empleados en esta prueba, se realizó considerando los resultados obtenidos en la prueba preliminar, donde se seleccionó aquella en donde no se observó efecto alguno, es decir no existía diferencia estadísticamente significativa respecto al control, y la menor concentración que ocasionó efecto significativo en la fisiología de las plántulas, siendo así 0.013 y 0.13 ppm las concentraciones elegidas, además se añadió un valor intermedio a evaluar.

Esta prueba se realizó con la finalidad de evaluar la recuperación de las plántulas al ser expuestas solamente durante sus primeras 48 h de germinación, además de evaluar el efecto que tiene el tipo de exposición, tal como reporta Song et al. (2013) al preparar las NPs y diluirlas, ya que aunque aparentemente se observe que están dispersas y se disuelvan rápidamente, algunas pueden formar aglomerados y precipitarse o bien, al emplear la técnica con el soporte del papel filtro pudieran quedar ahí ancladas imposibilitando la absorción de las NPs por las plántulas y de esta manera no se observe el efecto real de cada tratamiento aplicado. Por ello, se ponen contacto mediante inmersión y agitación que permita la mezcla total de las soluciones sin dañar las semillas.

Los resultados obtenidos en la prueba de inmersión se observan en el gráfico 2, en este caso ninguna de las concentraciones empleadas tuvo efectos estimulantes, sino al contrario, 0.013 ppm de ambas NPs y de la sal precursora ocasionaron inhibición en la elongación de raíz y radícula, así como la disminución de biomasa, así mismo este efecto es dependiente de la concentración, ya que al aumentar la dosis se ve afectada directamente la inhibición de las variables evaluadas.

De igual modo, se observa el efecto en el tamaño de las NPs aplicadas, ya que las NPs obtenidas por infusión muestran un mayor efecto inhibitorio en todos los casos que las de mayor tamaño, siendo la elongación de radícula y contenido de biomasa, las variables que mayoritariamente se ven afectadas, con una disminución de hasta un 50% respecto al control. Por otro lado, para el extracto acuoso de la perfolia de *Zea mays*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la elongación de radícula, pero sí en el contenido de biomasa.

Figura 4.3 Prueba de inmersión para la evaluación del efecto en la elongación de a) Hipocótilo, b) Radícula, c) Peso húmedo y d) Peso seco sobre la germinación de semillas de *L. sativa* al ser expuestas a 0.013, 0.065 y 0.13 ppm de AgCl/Ag NPs durante las primeras 48 h mediante un ensayo *in vitro*. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones realizadas para cada ensayo



3.4 Ensayos de toxicidad *in vivo*

La mayoría de los estudios realizados sobre los efectos de diversos tipos de NPs en semillas de importancia, han sido en su gran mayoría solamente sobre la etapa de la germinación; en este trabajo es de interés de evaluar el efecto de NPs biosintetizadas en el crecimiento y desarrollo de *Lactuca sativa* ya que, en su etapa de madurez, no es tan frágil como las plántulas. Por lo tanto, se evaluó la toxicidad de las NPs en plantas maduras en un ensayo en invernadero, en sustrato y en hidroponía, así mismo, se determinó el efecto de la adición de NPs por aspersión foliar y directo sobre el tallo.

Las concentraciones elegidas para este ensayo, fueron las mismas que se emplearon en la prueba preliminar, puesto que como se observó en la prueba por inmersión, el tipo de contacto que tengan las semillas con las NPs influye directamente en el comportamiento que las mismas presenten, por lo tanto y considerando lo reportado por Navarro et al. (2008), si las NPs se encuentran en estado coloidal, permanecerán dispersas, manteniendo su reactividad y comportamiento catalítico y de este modo podrán interactuar fácilmente con la materia orgánica presente en el medio, por ello se eligió trabajar con las mismas concentraciones, excepto con la concentración más alta.

Las AgCl/Ag NPs empleadas en los posteriores ensayos fueron obtenidas a partir del extracto obtenido por infusión, por ser las de menor tamaño con posibilidad de mostrar un mayor efecto tal como se observó en los estudios *in vitro*. Posterior a la síntesis de las NPs se les realizan lavados con la finalidad de eliminar el exceso de materia orgánica presente, obteniendo un precipitado y un sobrenadante, resultante de la separación de las NPs, ambas muestras se analizaron por absorción atómica, empleando solamente la concentración más alta de precipitado como referencia para realizar la dilución de la muestra de sobrenadante. El control empleado en todos los casos fue el de agua desionizada (0 ppm) para todos los ensayos realizados.

3.4.1 y 3.4.2 Etapa 1 y 2: Prueba de toxicidad aguda y subcrónica (4 y 6 semanas) en sustrato

La tabla 4.2 muestra el efecto de la adición de concentraciones logarítmicas de AgCl/Ag NPs sobre el contenido de biomasa y clorofilas *a*, *b*, y *c*. Las variables de peso seco y peso húmedo que están marcadas con asterisco se refieren a aquellas que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Se observa que a las cuatro semanas que se evaluó el peso seco y peso húmedo, todas las concentraciones evaluadas, excepto la de 1.3 ppm mostraron un efecto estimulante respecto al control, así mismo a las 10 semanas de exposición, fue a 1.3 ppm donde se observó un efecto significativo solamente en el contenido de peso húmedo, mientras que, para el contenido de biomasa, todas las dosis aplicadas mostraron efectos estimulantes.

Por otro lado, el contenido de clorofila presente a las 4, 6 y 10 semanas se ve disminuido en el control, debido a que esta disminuye conforme aumenta la maduración. De forma complementaria a los datos de peso seco y húmedo, se observa que a 1.3 ppm se tiene un efecto significativo respecto al control, el cual ocasiona un decremento en el contenido de clorofila conforme aumenta el tiempo de exposición.

Tabla 4.2 Prueba de toxicidad aguda y subcrónica. Efecto en peso húmedo, peso seco y contenido de clorofila *a*, *b* y *c* al ser expuestas a 0.013, 0.13, 1.3 y 13 ppm de AgCl/Ag NPs durante 4, 7 y 10 semanas en sustrato

Variables	Control	AgCl/Ag NPs				
	0 mg/L (H)	0.013 mg/L (P)	0.13 mg/L (P)	1.3 mg/L (P)	13 mg/L (P)	13 mg/L (S)
Tiempo de exposición: 4 semanas (trasplante)						
P. húmedo	2.65 ± 0.04	3.19 ± 0.06*	3.07 ± 0.02*	1.92 ± 0.07*	2.82 ± 0.35	3.17 ± 0.03*
P. seco	0.15 ± 0.004	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.007	0.13 ± 0.004	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.005*
Clorofila <i>a</i>	24.87	24.84	24.77	24.48	24.78	22.82
Clorofila <i>b</i>	24.32	24.22	27.35	15.72	26.48	12.94
Clorofila <i>c</i>	24.60	23.22	31.42	10.88	28.14	7.77
Tiempo de exposición: 7 semanas						
Clorofila <i>a</i>	12.26	1.26	16.86	5.07	10.26	22.05
Clorofila <i>b</i>	9.82	72.04	13.18	4.27	7.38	12.03
Clorofila <i>c</i>	0.46	0	6.59	1.54	2.43	5.33
Tiempo de exposición: 10 semanas						
P. húmedo	189.91 ± 0.45	199.85 ± 0.62*	211.36 ± 0.58*	174.96 ± 0.17*	160.11 ± 0.86*	218.80 ± 0.33*
P. seco	16.19 ± 0.19	20.53 ± 0.15 *	18.07 ± 0.10 *	22.47 ± 0.04 *	16.23 ± 0.18	21.38 ± 0.35 *
Clorofila <i>a</i>	4.67	5.87	6.61	6.12	24.32	9.57
Clorofila <i>b</i>	15.51	3.02	5.19	3.90	16.30	4.85
Clorofila <i>c</i>	14.95	0.02	9.15	7.67	17.07	2.32

Los datos de peso húmedo y peso seco corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo, (\pm desviación estándar), los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey. (P): precipitado y (S): sobrenadante de NPs resultantes de los lavados; (H): Agua desionizada.

La tabla 4.2, muestra el efecto de la adición de NPs a 0.013 y 1.3 ppm, durante 4 semanas en sustrato y posteriormente 3 y 7 semanas en un sistema de hidroponía de raíz flotante. Donde se observa que a 0.013 ppm se tiene un efecto estimulante en peso húmedo y seco, mientras que a 1.3 ppm muestra un efecto inhibitorio respecto al control, donde en ambos casos solamente el peso húmedo representa diferencias estadísticamente significativas. A diferencia de la exposición en sustrato, en este caso se observa que, al aumentar el tiempo de exposición, el peso seco y peso húmedo tienen una disminución significativa que ocasiona hasta un 80% y 30 % en la reducción de los pesos al adicionar 1.3 y 0.013 ppm respecto al control, mientras que cuando se evaluó en sustrato, 0.013 ppm mostraban efectos benéficos al inducir un aumento en el contenido de biomasa conforme aumentaba el tiempo de exposición. En cuanto al contenido de clorofila se observa que 0.013 ppm actuaron como estimulante, mientras que 1.3 ppm propiciaron una reducción significativa en el contenido de clorofilas presente, siendo la clorofila *c*, la que se redujo en mayor proporción respecto a la *a* y *b*.

La figura 4.4 a, muestra el efecto de la adición de 0.013-13 ppm de AgCl/Ag NPs sobre la elongación de raíz y tallo al exponerlas durante 4 y 6 semanas de crecimiento en sustrato. El análisis estadístico muestra diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos aplicados excepto a 0.13 ppm para la elongación de raíz a las 4 semanas de exposición.

Tabla 4.3 Prueba de toxicidad subcrónica. Efecto en peso húmedo, peso seco y contenido de clorofila a, b y c al ser expuestas a 0.013, 013, 1.3 y 13 ppm de AgCl/Ag NPs durante 4 semanas en sustrato y posteriormente 3 y 6 semanas en hidroponía

Variables	Control		AgCl/Ag NPs	
	0 mg/L (H)	0.013 mg/L (P)	1.3 mg/L (P)	13 mg/L (P)
Tiempo de exposición: 4 semanas (sustrato). Trasplante				
P. húmedo	2.65 ± 0.04	3.19 ± 0.06*	1.92 ± 0.07*	
P. seco	0.15 ± 0.004	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.004	
Clorofila a	24.87	24.84	24.48	
Clorofila b	24.32	24.21794	15.72	
Clorofila c	24.60	23.22	10.88	
Tiempo de exposición: 7 semanas, 3 en hidroponía				
Clorofila a	16.3555	24.73016	9.58362	
Clorofila b	13.20706	31.7042	24.84854	
Clorofila c	5.07988	48.92768	0.053	
Tiempo de exposición: 10 semanas, 7 en hidroponía				
P. húmedo	71.99 ± 0.83	46.41 ± 0.47*	12.21 ± 0.14*	
P. seco	7.41 ± 0.20	5.72 ± 0.42*	1.20 ± 0.15*	
Clorofila a	25.45912	16.34019	12.83048	
Clorofila b	21.92484	20.70498	4.27828	
Clorofila c	22.38568	20.20814	5.5448	

Los datos de peso húmedo y peso seco corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo, (\pm desviación estándar), los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey. (P): precipitado de NPs resultantes de los lavados; (H): Agua desionizada.

3.4.1 y 3.4.2 Etapa 1 y 2: Prueba de toxicidad aguda y subcrónica (4 y 6 semanas) en hidroponía

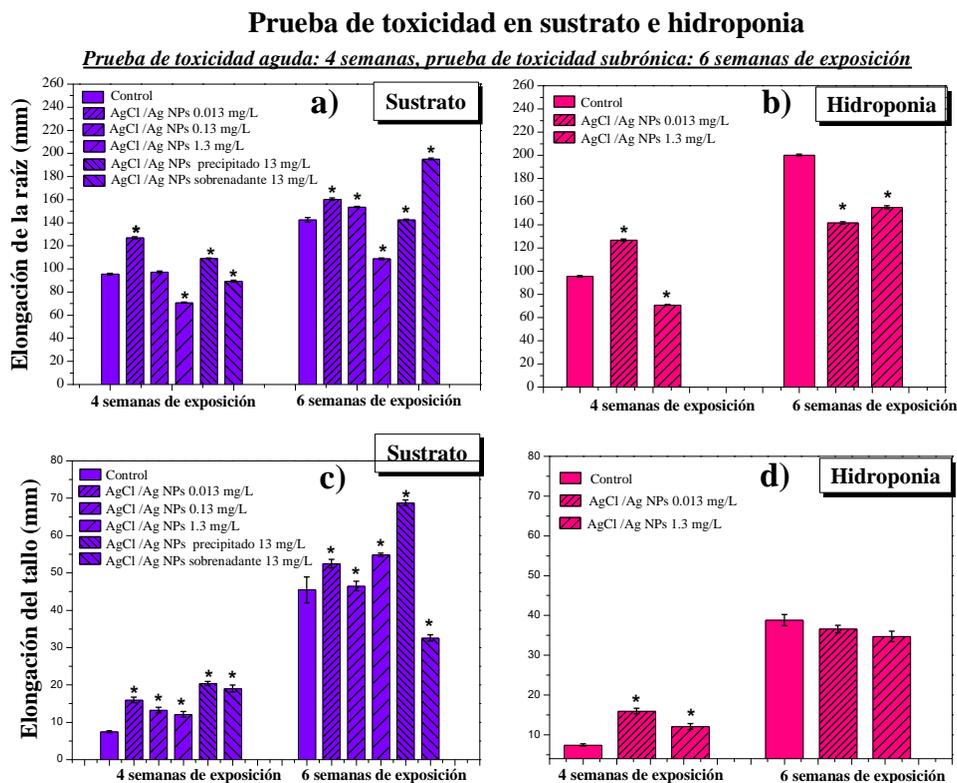
El efecto de las NPs sobre la elongación de raíz en sustrato, muestran que nuevamente 1.3 ppm ocasionan efectos significativos en la reducción del tamaño de la raíz a las 4 y 6 semanas de exposición, mientras que, con las demás concentraciones, se observa un efecto estimulante en su crecimiento dependiente del tiempo de exposición, ya que en las primeras 4 semanas 0.013 ppm ocasionaba el mayor efecto estimulante, mientras que a las 6 semanas fue la muestra de 13 ppm de sobrenadante.

Por otro lado, aquellas que fueron trasplantadas al sistema de hidroponía, 0.013 ppm pasó de ser una concentración que promover un efecto estimulante a ocasionar una disminución del tamaño, afectando aún más que la concentración más alta que se aplicó.

Para el caso de la elongación de la raíz al ser expuesta en sustrato, el análisis mostró diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos aplicados durante los dos periodos de exposición, en la primera etapa, todas las concentraciones mostraron efectos benéficos al aumentar el tamaño de la raíz, mientras que al aumentar el tiempo de exposición, 13 ppm de sobrenadante ocasionaron una reducción en la elongación de la raíz de un 20% respecto al control.

El efecto en la elongación de raíz cuando se trasplantó a hidroponía, tuvo el mismo efecto que para el tallo, ya que ambas concentraciones aplicadas ocasionaron un decremento en la misma, sin embargo, según el análisis estadístico, este decremento no era significativo respecto al control.

Figura 1.4 a) Efecto en la elongación de la raíz de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 0.13, 1,3 y 13 ppm de sobrenadante y precipitado de AgCl/Ag NPs durante 4 y 10 semanas, en sustrato y b) en hidroponía c) Efecto en la elongación del tallo de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 0.13, 1,3 y 13 ppm de sobrenadante y precipitado de AgCl/Ag NPs durante 4 y 10 semanas, en sustrato y d) en hidroponía. Los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey, correspondientes al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo



3.4.3 Evaluación de la adición de NPs a plántulas de *L. sativa* después de 4 semanas de crecimiento directa al tallo y foliar

En la tabla 4.4 se muestra el peso seco, peso húmedo y contenido de clorofila como variables de respuesta al exponer a plantas de *L. sativa* después de su trasplante durante 3 y 6 semanas a 0.013 y 1.3 ppm de AgCl/Ag NPs mediante la aplicación directa al tallo y por aspersión a las hojas.

Este experimento pone en evidencia el efecto que tiene, la aplicación de las NPs ya sea directo al tallo o en las hojas, ya que respecto al peso húmedo y peso seco obtenidos, se observa que 0.013 ppm ocasionan un decremento al ser exponer a *L. sativa* durante 6 semanas mediante aspersión foliar, mientras que al aplicar las NPs directamente sobre el tallo, éstas presentan un efecto estimulante en el aumento de peso seco y húmedo que es directamente proporcional a la concentración aplicada, es decir, entre mayor concentración, mayor es el contenido de biomasa presente.

Mientras que para el contenido de clorofila, en la exposición foliar a 0.013 ppm aumentaba el porcentaje obtenido, a 1.3 ppm se daba un decremento significativo. Por otro lado, para la exposición directa, un aumento en la concentración de las NPs propiciaba también un aumento en el contenido de clorofilas dependiente también del tiempo de exposición.

Los efectos en la elongación de raíz y tallo al aplicar NPs durante 6 semanas en sustrato e hidroponía se muestran en la figura 4.5. El análisis ANOVA realizado mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos empleados para las variables de respuesta evaluadas. Un efecto estimulante en el crecimiento del tallo, dependiente de la concentración fue observado al adicionar 0.013 y 1.3 ppm de AgCl/Ag NPs en la exposición directa al tallo, caso contrario al aplicarlas en las hojas, ya que en este caso mostraron un efecto adverso proporcional a la concentración aplicada, siendo el mismo efecto para el tallo.

Tabla 4.4 Prueba de exposición después del trasplante en sustrato. Efecto en peso húmedo, peso seco y contenido de clorofila a, b y c al ser expuestas a 0.013 y 1.3 ppm de AgCl/Ag NPs durante 6 semanas por contacto directo sobre el tallo y aspersión foliar

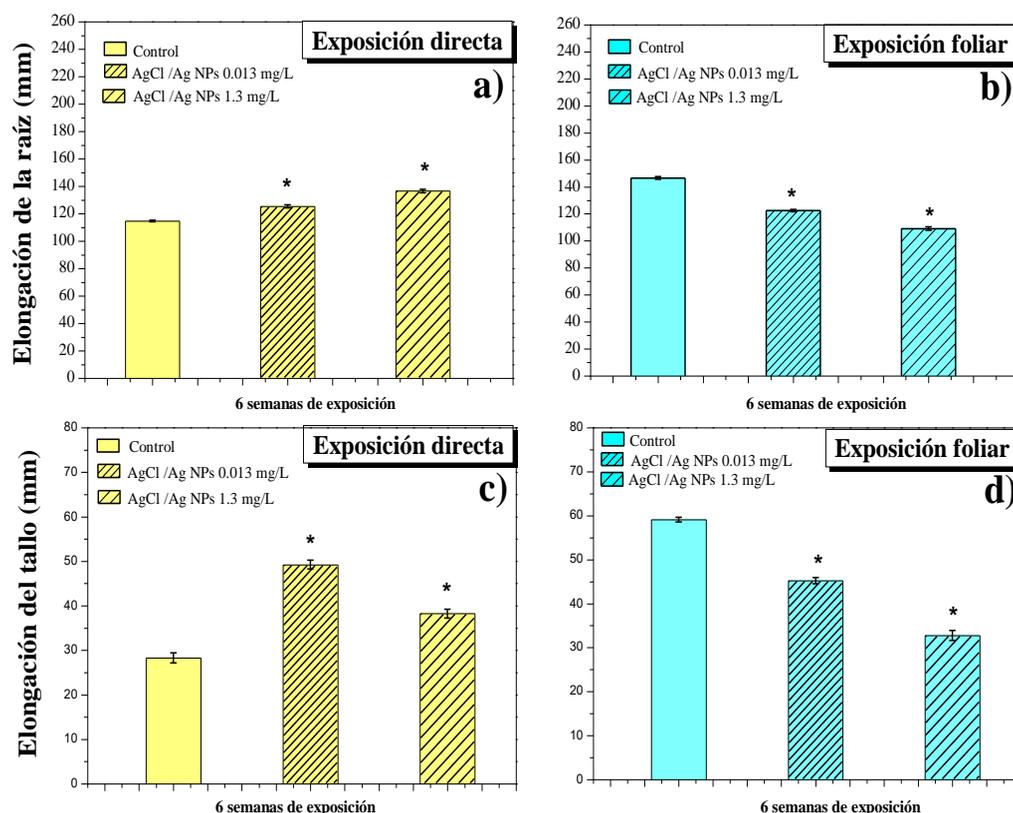
Variables	Tratamientos					
	Control		AgCl/Ag NPs			
	0 mg/L (H)		0.013 mg/L (P)		1.3 mg/L (P)	
Tiempo de exposición: 3 semanas						
	Foliar	Directa	Foliar	Directa	Foliar	Directa
Clorofila <i>a</i>	16.3555	4.96648	24.73016	3.33764	9.58362	9.17747
Clorofila <i>b</i>	13.20706	3.84854	31.7042	2.1666	24.84854	6.98878
Clorofila <i>c</i>	5.07988	1.50936	48.92768	1.60976	0.053	2.3019
Tiempo de exposición: 6 semanas						
P. húmedo	194.46 ± 0.07	163.28 ± 0.30	192.77 ± 0.06*	187.22 ± 0.16*	195.82 ± 0.08*	239.31 ± 0.30*
P. seco	17.7 ± 0.38	14.40 ± 0.42	16.38 ± 0.38	17.36 ± 0.47	19.20 ± 0.01	20.45 ± 0.28
Clorofila <i>a</i>	6.11049	6.18202	6.17962	6.15289	5.18109	8.73947
Clorofila <i>b</i>	4.97904	4.20004	3.8796	4.46126	3.77124	4.23298
Clorofila <i>c</i>	6.20818	6.857	12.65732	9.57986	3.46986	3.6271

Los datos de peso húmedo y peso seco corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo, (\pm desviación estándar), los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey. (P): precipitado de NPs resultantes de los lavados; (H): Agua desionizada.

Con respecto a la elongación del tallo en la exposición directa, se observó de igual manera un efecto estimulante en su crecimiento, siendo 0.013 ppm la que propiciaba aún más su crecimiento, respecto a la concentración más alta evaluada.

Figura 4.5 a) Efecto en la elongación de la raíz de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 1,3 ppm de AgCl/Ag NPs durante 6 semanas directo al tallo de la plántula y b) por aspersión foliar c) Efecto en la elongación del tallo de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 0.13, 1,3 y 13 ppm de sobrenadante y precipitado de AgCl/Ag NPs durante 4 y 10 semanas, directo al tallo de la plántula y d) por aspersión foliar. Los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey, correspondientes al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo.

a) Evaluación de la adición de NPs a plántulas de *L. sativa* después de 4 semanas de crecimiento



4. Discusión

Los efectos fitotóxicos evaluados en los ensayos *in vitro* demostraron que la toxicidad de las NPs es dependiente de la concentración, tamaño y tipo de contacto que tengan las AgCl/Ag NPs sintetizadas, tal como se ha reportado para partículas obtenidas por métodos químicos, como reportan Hong et al. (2005) que evaluaron la adición de NPs de TiO₂ sobre *Spinacia oleracea*, los resultados mostraron que al tratar las plántulas con 0.25% de NPs de TiO₂ aumentaba el peso fresco y seco, la clorofila *a* y *b* y la tasa fotosintética con respecto a los controles, sin embargo, por encima de 0.4 % disminuían las características fisiológicas en gran medida.

Así mismo, el trabajo reportado por Iram et al. (2014) que reportan el efecto de Ag NPs de 6 nm, obtenidas a partir del glicoxilano empleado como agente reductor, extraído de *Mimosa pudica*, donde las Ag NPs mostraron un efecto estimulante en el crecimiento de raíz, dependiente de la concentración, ya que al exponer las plántulas a las concentraciones más altas de 27 µg/mL presentaban inhibición en la elongación de la raíz, mientras que a la concentración más baja; 13.5 µg/mL, se encontraba el efecto estimulante.

Thuesombat, Hannongbua, Akasit, & Chadchawan (2014), demostraron el efecto dependiente de la concentración y tamaño al evaluar Ag NPs sobre la germinación de *Oryza sativa*. La germinación de las semillas y el posterior crecimiento de las plántulas disminuyeron conforme el tamaño y concentración de Ag NPs aumentaba. La exposición de las plántulas a las concentraciones más altas de NPs entre 100 y 1000 ppm y el rango de diámetro de 20-150 nm aumentaba el nivel de inhibición de la germinación y posterior crecimiento de las plántulas, debido principalmente a la penetración y transporte de NPs a través de los tejidos de la planta.

Como se observa, el tamaño y concentración de NPs están directamente relacionados con la reactividad interfacial y la capacidad de atravesar las barreras fisiológicas. En varios estudios se ha demostrado que la absorción y fitotoxicidad de las NPs son dependientes del tamaño de partícula, con tamaños de partícula más pequeños generalmente existen niveles de acumulación más altos, teniendo como consecuencia una mayor toxicidad en comparación con los mismos materiales a granel, tal como se observó para la sal precursora, que demostró un menor efecto que las NPs evaluadas a la misma concentración.

Con los ensayos de toxicidad *in vivo* se pusieron en evidencia los efectos, de medio en el que se ponen en contacto las NPs, tiempo de exposición y forma en la que se apliquen las partículas. Además, la respuesta de la toxicidad de las partículas evaluadas difiere a los estudios en placas Petri, ya que las mismas concentraciones evaluadas, mostraron efectos estimulantes en el crecimiento de raíz y tallo al exponerlas en sustrato mientras que en los ensayos *in vitro* disminuían hasta un 50% su elongación.

Tal efecto fue reportado por Lee et al. (2012), al evaluar Ag NPs recubiertas de citrato, en estado coloidal con tamaño de partícula de 5-25 nm y moda de 10 nm sobre *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor*, el estudio fue realizado en placas Petri con agar-agar y un suelo artificial, sus resultados mostraron efectos adversos sobre el crecimiento de las plántulas, dependientes de la concentración, a 40 mg/L el porcentaje de crecimiento de *P. radiatus* y *S. bicolor* respecto al control era de 20 y 47%, detectando signos de necrosis en las raíces de ambas plantas, mientras que para los ensayos en suelo fue de alrededor del 20% con 2000 mg/kg de suelo seco. Los autores mencionan que estos efectos pueden ser debido a cambios en las propiedades fisicoquímicas de las NPs en suelo, y la tendencia a la aglomeración de las partículas, es posible que los agregados fueran más grandes que el tamaño de poro de la célula de la raíz de la planta, y así algunos agregados no pasaron a través de las células de la planta.

Una mayor agregación puede ser la principal razón para la reducción de la fitotoxicidad de los Ag NPs en suelo que en el estudio *in vitro*. Además, en el presente trabajo, las NPs pueden ser absorbidas por la superficie de vermiculita, que puede retener más Ag debido a su alta capacidad de intercambio catiónico. Por otro lado, la plata tiende a formar enlaces S-Ag-S por unión con azufre inorgánico y orgánico, por lo que se redujeron las cantidades de nanopartículas disponibles para las plantas.

Las plantas tienden a responder de forma morfológica y fisiológica a las condiciones ambientales en las que se desarrollan, modificando la velocidad de crecimiento, la producción de estructuras secundarias y la cantidad de pigmentos entre otras características. La clorofila, responsable de la fotosíntesis, donde la energía lumínica es transformada en energía química por plantas, algas y algunas bacterias, se considera una medida indirecta del estado nutricional de la planta. Los factores exógenos importantes para que se lleve a cabo la transformación lumínica son: energía radiante, humedad, temperatura y estrés hídrico. Las plantas sometidas a cualquier tipo de estrés tienden a perder capacidad fotosintética y disminuir el contenido de clorofila de sus hojas.

5. Conclusiones

La concentración, tamaño, y tipo de exposición de AgCl/Ag NPs que se aplique durante la germinación está directamente relacionada con la elongación de radícula, hipocótilo y biomasa de las plántulas de *L. sativa*. En las pruebas de toxicidad en cajas Petri, se observó que 1.3 ppm son suficientes para ocasionar un decremento significativo en las características fisiológicas, en comparación con el control, mientras que 0.013 ppm ocasiona un efecto estimulante en el tamaño de raíz. La toxicidad de las NPs se ve disminuida al aplicarla sobre un suelo artificial, el contenido de clorofila como factor de estrés se ve mayormente afectado con 1.3 ppm, el peso seco, peso húmedo elongación de raíz y tallo se ven influenciados por el tiempo y tipo de contacto que se tenga con las NPs, siendo la exposición en hidroponía y foliar las que se ven mayormente afectadas conforme aumenta a concentración de NPs aplicada. Un buen entendimiento de las propiedades fisicoquímicas de las NPs ayuda a relacionar los efectos que las partículas pueden presentar en el medio, es por ello que es de vital importancia su caracterización para alertar los posibles riesgos a los que se exponen los sistemas biológicos y de manera indirecta, a los seres humanos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACyT por la beca de MGYC y por el apoyo al proyecto INFR 2018 (294909). También agradecen al M.M. R. González Montes de Oca (LaNBA-UPP) y a la Dra. M.A. Hernández-Pérez (ESIQIE-IPN) por los análisis realizados.

Referencias

- Al-huqail, A. A., Hatata, M. M., Al-huqail, A. A., & Ibrahim, M. M. (2017). Preparation, Characterization of silver Phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.013>
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M. R., & Bottero, J. Y. (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution*, 157(4), 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.002>
- Balalakshmi, C., Gopinath, K., Lokesh, R., Arumugam, A., Naiyf, S., Kadaikunnan, S., Benelli, G. (2017). Green synthesis of gold nanoparticles using a cheap *Sphaeranthus indicus* extract: Impact on plant cells and the aquatic crustacean *Artemia nauplii*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.040>
- Cecilia Sobrero, M., & Ronco, A. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* L. In *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Vol. 39, pp. 561–563. México.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1985). *Handbook_of_seed_technology_for_genebanks_433.pdf*. In *Handbook of seed technology for genebanks. Volume 1. Principles and methodology* (p. 210). Italy: International Board for Plant Genetic Resources. Handbooks for Genebanks, No. 2.
- Farghaly, F. A., & Nafady, N. A. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Rosmarinus officinalis* and Its Effect on Tomato and Wheat Plants. *Journal of Agricultural Science*, 7(11), 277–287. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n11p277>

- Garg, P., & Malik, C. P. (2014). Influence of Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth of *Vigna radiata* L., 4(1), 1–12.
- Gopinath, K., Venkatesh, K. S., Ilangovan, R., Sankaranarayanan, K., & Arumugam, A. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles from leaf extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced mitotic cell division and pollen germination activity. *Industrial Crops & Products*, 50, 737–742. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.060>
- Greene, J. C., Bartels, C. L., Warren-Hicks, W. J., Parkhurst, B. R., & Linder, G. L. (1988). *Protocols for short-term toxicity screening of hazardous-waste sites*. United States.
- Hong, F., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L., & Yang, P. (2005). Effect of Nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research*, 105(1–3), 269–279. <https://doi.org/10.1385/BTER:105:1-3:269>
- Iram, F., Iqbal, M. S., Athar, M. M., Saeed, M. Z., Yasmeen, A., & Ahmad, R. (2014). Glucoxylation-mediated green synthesis of gold and silver nanoparticles and their phyto-toxicity study. *Carbohydrate Polymers*, 104(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.002>
- Jayarambabu, N., & Rao, K. V. (2016). Journal of Scientific Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized From *Curcuma Longa* Extract for Seed Germination, (January), 1–6. <https://doi.org/10.20448/journal.510/2016.3.1/510.1.70.74>
- Kim, D., Saratale, R. G., Shinde, S., Syed, A., Ameen, F., & Ghodake, G. (2017). SC. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.123>
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., & Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013>
- Lee, W. M., Kwak, J. Il, & An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.013>
- Malathi, S., & Palani, P. (2016). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles and its impact on the germination of *Solanum Lycopersicum* L., 343–346.
- Moorthy, S. K., Ashok, C. H., Rao, K. V., & Viswanathan, C. (2015). MgO nanoparticles by *Neem* leaves through green method. *Materials Today: Proceedings*, 2(9), 4360–4368. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.10.027>
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Ndeh, N. T., Maensiri, S., & Maensiri, D. (2017). The effect of green synthesized gold nanoparticles on rice germination and roots *, (8), 10.
- Parveen, A., & Rao, S. (2014). Effect of Nanosilver on Seed Germination and Seedling Growth in *Pennisetum glaucum*. <https://doi.org/10.1007/s10876-014-0728-y>
- Sabir, S., Arshad, M., Satti, S. H., Tayyaba, B., & Farqaulit, F. (2018). Effect of green synthesized silver nanoparticles on seed germination and seedling growth in wheat, 12(4), 1–7.
- Sahayaraj, K., & Rajesh, S. (2015). Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications, (September), 228–244.

- Singh, A., Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., Yadav, V., & Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nano zinc oxide and evaluation of its impact on germination and metabolic activity of *Solanum lycopersicum*. *Journal of Biotechnology*, 233, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.010>
- Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., & Lee, E. J. (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.033>
- Thuesombat, P., Hannongbua, S., Akasit, S., & Chadchawan, S. (2014). Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104(1), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.022>
- Trinh, N. D., Nguyen, T. T. B., & Nguyen, T. H. (2015). Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 6(4). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/6/4/045011>
- Villanueva-Ibáñez, M., Yañez-Cruz, M. G., Álvarez-García, R., Hernández-Pérez, M. A., & Flores-González, M. A. (2015). Aqueous corn husk extract - Mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles. *Materials Letters*, 152(August), 166–169. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.097>
- Yañez Cruz, M. G., Villanueva Ibáñez, M., Álvarez García, R., Flóres González, M. A., Tovar Jiménez, X., Cadena Ramírez, A., & Hernández Pérez, M. de los Á. (2017). Influencia del método de obtención del extracto de perfolia de maíz en la biosíntesis de nanoestructuras de AgCl/Ag y fitotoxicidad en plántulas de *Latuca sativa* L. var. *longifolia*. *Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología*, 1(1), 20–25.
- Yugandhar, P., & Savithramma, N. (2016). Green synthesis of calcium carbonate nanoparticles and their effects on seed germination and seedling growth of *Vigna mungo* (L.). Hepper. *International Journal of Advanced Research*. 1(8), 89-103.