



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD SALTILLO

**Efecto de nanopartículas de ZnO, TiO₂ y Fe₂O₃
en el crecimiento y desarrollo del cultivo de
maíz**

Tesis que presenta
Nancy Daniela Uresti Durán

Para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias

En la Especialidad de
Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía

Directores:
Dr. Fabián Fernández Luqueño
Dra. María Esther Sánchez Castro

Ramos Arizpe, Coah.

Mayo 2016

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca con número 303312 para realizar mis estudios de Maestría.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Y por último... deseo dedicarme este momento tan importante e inolvidable; por no dejarme vencer, ya que en ocasiones el principal obstáculo se encuentra dentro de uno mismo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que es todo para mí, gracias porque siempre he contado con su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida

A mi novio, por permanecer en todo momento a mi lado

A mis compañeros de generación, muchísimas gracias por hacer que mi estancia en el Cinvestav fuera tan feliz

Los amigos son la familia que uno escoge, a todos ellos por siempre echarme porras y por meterse conmigo hasta el invernadero

Al Cinvestav por brindarme la oportunidad de realizar un posgrado y brindarme las herramientas necesarias para realizar esta investigación

Al Dr. José Luis Martínez Hernández por su amistad y cariño

A mis Directores de tesis por la paciencia y el tiempo invertido

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría

CONTENIDO

RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	16
I. INTRODUCCIÓN.....	18
II. ANTECEDENTES.....	20
2.1 El cultivo de maíz.....	20
2.1.1 Origen y descripción botánica.....	20
2.1.2 La planta: partes del maíz.....	20
2.1.3 Usos del cultivo de maíz.....	22
2.1.4 Importancia social y ambiental del maíz.....	22
2.1.5 Maíz: variedad Antonio Narro (VAN-210).....	24
2.1.6 Requerimientos agroecológicos del cultivo.....	24
2.2 Nanociencia, nanotecnología y NPs.....	25
2.2.1 Definiciones.....	26
2.2.2 NPs de ZnO, TiO ₂ y Fe ₂ O ₃	26
2.3 Presencia de NPs en el medio ambiente.....	28
2.3.1 Transformación de las NPs en el medio ambiente.....	30
2.3.2 Toxicidad de las NPs.....	31
2.4 Efecto de NPs en los cultivos.....	34
III. JUSTIFICACIÓN.....	38
IV. HIPÓTESIS.....	38
V. OBJETIVOS.....	40
5.1 Objetivo general.....	40
5.2 Objetivos específicos.....	40
VI. METODOLOGÍA CIENTÍFICA.....	42
6.1 Experimento en laboratorio (prueba de germinación).....	42
6.1.1 Materiales e infraestructura.....	42
6.1.2 Tratamientos.....	43
6.1.3 Diseño experimental y modelo estadístico.....	44
6.1.4 Unidades experimentales.....	45
6.2 Experimento en invernadero (cultivo de maíz).....	46
6.2.1 Materiales e infraestructura.....	46
6.2.2 Tratamientos.....	48
6.2.3 Diseño experimental y modelo estadístico.....	50
6.2.4 Unidades experimentales.....	50

6.2.5 Caracterización fisicoquímica del suelo	51
6.2.6 Caracterización del crecimiento y desarrollo del cultivo.....	51
6.3 Análisis estadístico.....	53
VII. RESULTADOS.....	54
7.1 Ensayo de germinación	54
7.1.1 Suspensiones de NPs.....	54
7.1.2 Germinación.....	55
7.2 Ensayo en invernadero	58
7.2.1 Suelo.....	58
7.2.2 Fenología	59
7.2.3 Fisiología.....	60
7.2.4 Características de la planta: biomasa y longitud	63
7.2.5 Componentes de rendimiento a la cosecha	65
VIII. DISCUSIONES.....	68
8.1 Ensayo de germinación	68
8.2 Ensayo en invernadero	71
IX. CONCLUSIONES.....	76
X. PERSPECTIVAS	78
XI. BIBLIOGRAFIA.....	80
XII. ANEXOS.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas fenológicas del cultivo de maíz.....	22
Figura 2. Producción regional promedio de maíz (2000-2011).....	23
Figura 3. Tamaño de las NPs con respecto a macro partículas.....	25
Figura 4. Flujo de NPs en 2010 (toneladas métricas año ⁻¹) desde la manufactura hasta las aplicaciones y su eventual disposición.....	28
Figura 5. Distribución de NPs de tres tipos de tamaños diferentes en los brotes a nivel de órganos, tejidos y paredes celulares.....	35
Figura 6. Dinámica teórica de las NPs en el suelo.....	36
Figura 7. Distribución de las unidades experimentales (UE) para las pruebas de germinación. A: Zn-3 y Zn-6; B: Ti-3 y Ti-6; C: Fe-3 y Fe-6; D: Control; E: Colores de los tratamientos; F: Distribución de semillas en el interior de cada unidad experimental.....	44
Figura 8. Vista aérea del área de muestreo.....	47
Figura 9. Distribución de los tratamientos del experimento del cultivo de maíz; S1, S2 y S3= muestras de suelo compuestas, réplica 1.....	49
Figura 10. Distribución de los tratamientos del experimento del cultivo de maíz; S1, S2 y S3= muestras de suelo compuestas, réplica 2.....	49
Figura 11. Porcentaje de germinación de semillas de maíz, determinado en condiciones de laboratorio. La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 2. n=12 (4 cajas Petri x triplicado).....	54
Figura 12. Porcentaje del tamaño de partícula presente en cada suelo.....	57
Figura 13. Inicio de las etapas fenológicas de emergencia (VE) y aparición de hojas (V1..Vn) en el cultivo de maíz tratado con diferentes concentraciones y tipos de NP.....	58
Figura 14. Inicio de las etapas fenológicas de aparición de la panoja (VT), floración (R0), aparición del estilo (R1) y llenado de grano (R2...R6).....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requerimientos agroecológicos del maíz.....	24
Tabla 2. Características de las NPs que se utilizaron en los experimentos.....	42
Tabla 3. Tratamientos del experimento de germinación de maíz.....	43
Tabla 4. Características de las NPs que se utilizaron en los experimentos.....	46
Tabla 5. Tratamientos usados en los experimentos de invernadero.....	48
Tabla 6. Caracterización de las suspensiones empleadas para tratar semillas o plantas de maíz en condiciones de laboratorio o invernadero.....	54
Tabla 7. Características de las plántulas de maíz tratadas durante siete días con diferentes dosis y tipos de NP.....	56
Tabla 8. Peso fresco y seco de secciones de 25 plántulas de maíz tratadas durante siete días con diferentes dosis y tipos de NPs.....	57
Tabla 9. Caracterización de los tres suelos muestreados en la misma parcela y empleados en el experimento de invernadero.....	58
Tabla 10. Unidades SPAD de maíz cultivadas en invernadero durante 112 días y acondicionadas con NPs de Zn, Ti y Fe a 200 y 400 mg kg ⁻¹ de suelo seco.....	62
Tabla 11. Características de las plantas de maíz cultivadas en invernadero. Se presentan las medias de los tratamientos en sus tres cortes. Todo el experimento se repitió dos veces.....	63
Tabla 12. Características de las plantas de maíz cultivadas en invernadero. Se presentan las medias de los tratamientos en sus tres cortes. Todo el experimento se repitió dos veces.....	64
Tabla 13. Efecto de NPs de ZnO, TiO ₂ y Fe ₂ O ₃ sobre las características del fruto de maíz cultivado en invernadero.....	65
Tabla 14. Efecto de la concentración de NP de ZnO, TiO ₂ y Fe ₂ O ₃ sobre las características del fruto de maíz cultivado en invernadero.....	66

RESUMEN

La producción industrial de nanopartículas (NPs) y su liberación al medio ambiente podrían limitar el rendimiento de los cultivos agrícolas, por lo que es necesario evaluar el impacto de las NPs sobre estos. En esta investigación se evaluó el efecto de las NPs de ZnO, TiO₂ y Fe₂O₃, a concentraciones de 0, 3 y 6 gL⁻¹, en el porcentaje de germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.), durante un experimento en laboratorio de siete días. Además, se determinó el efecto de las NPs en la producción de clorofila, el inicio de las etapas fenológicas y algunas características de biomasa y componentes de rendimiento de plantas de maíz, durante pruebas en invernadero por 112 días. Las NPs modificaron significativamente los pesos fresco o seco del epicótilo, hipocótilo o cotiledón y las unidades SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) durante la etapa vegetativa, pero no durante la etapa reproductiva. Adicionalmente, las NPs no afectaron significativamente la aparición de las etapas fenológicas ni las características de planta, pero sí incrementaron significativamente el peso seco y fresco del fruto y el peso seco de las mazorcas. Sin embargo, solo las dosis de 6 gL⁻¹ incrementaron significativamente el peso seco de la semilla. Lo anterior implica que las dosis altas de NPs en el medio ambiente podrían favorecer el desarrollo del cultivo de maíz, no obstante, es importante considerar que la respuesta favorable del maíz inducida por las NPs tiene un límite.

ABSTRACT

The industrial production of nanoparticles (NPs) and their releasing to the environment could limit the performance of agricultural crops, so it is necessary to evaluate the impact of NPs on crops. In this study the effect of ZnO, TiO₂ and Fe₂O₃ NPs, at 0, 3 or 6 gL⁻¹ on the percentage of germination of corn seeds (*Zea mays* L.) was evaluated in a seven days laboratory experiment. Furthermore, the effect of NPs on the production of chlorophyll, the onset of the phenological stages and some characteristics of biomass and yield components of corn plants were also determined in a 112 d greenhouse experiment. The NPs significantly modified the fresh or dry epicotyl, hypocotyl or cotyledon weights and SPAD units during the vegetative stage, but not during the reproductive stage. In addition, the NP did not significantly affect the occurrence of phenological stages and the characteristics of plant, but significantly increased dry and fresh fruit weight and dry weight of cobs. However, doses of 6 gL⁻¹ significantly increased the dry weight of the seed. This implies that high doses of NPs in the environment might increase the development of the maize crop, however, it is important to consider that the positive response of maize induced by NP is limited.

I. INTRODUCCIÓN

El rápido desarrollo de la nanotecnología abre nuevas posibilidades en el campo de la ciencia y la tecnología; sus aplicaciones abarcan desde la electrónica y comunicaciones, hasta la agricultura, química, biología, bioquímica, medicina, entre otras. La nanotecnología hace referencia a la integración de diferentes disciplinas científicas capaces de crear y desarrollar nuevos materiales a esta escala. Lo anterior ha causado un aumento en el uso de nanomateriales en procesos industriales, lo que probablemente conducirá a una mayor probabilidad de exposiciones ambientales. Las nanopartículas (NPs) son materiales con dimensiones nanométricas de entre 1 y 100 nm [1], las cuales debido a su tamaño presentan propiedades únicas, que no se presentan a tamaños convencionales, lo que puede traer como consecuencia riesgos para la salud del hombre y su entorno. Lo anterior es debido a que los mecanismos biológicos normales de defensa pueden no ser capaces de responder adecuadamente a estas partículas que pueden tener características tan diferentes. Por otro lado las nanopartículas pueden propagarse y persistir en el medio ambiente, pudiendo tener un importante impacto medio ambiental.

Es fundamental poder estimar la liberación y destino de las nanopartículas en el ambiente, su toxicidad, así como generar materiales de referencia y definir protocolos de análisis y ensayos de toxicidad que tengan en cuenta las particularidades de estos materiales. Aunque en la literatura científica comienzan a aparecer estudios de este tipo, la información aún es limitada. Por tal motivo surge la preocupación de evaluar los riesgos medioambientales de estos materiales al entrar en contacto con los diferentes componentes de los ecosistemas. Dicho lo

anterior las NPs generadas a través de los procesos industriales tienen potencial para entrar en contacto con los cultivos alimenticios afectando el medio ambiente y la salud humana. Las plantas son importantes en los estudios de toxicidad, esto por las interacciones que tienen con el aire, suelo y agua, que están en mayor contacto con las NPs, aunado a esto por medio de las plantas se puede dar la interacción de NPs con especies superiores a través de la cadena alimenticia; por ello es necesario evaluar los efectos de las NPs para conocer su distribución en el medio ambiente, sus posibles efectos dañinos y su destino final [2].

Las NPs pueden interaccionar con las raíces de las plantas, las cuales podrían absorberse y transportarse transportándose a través de sistemas vasculares, dependiendo de las propiedades de la NP y la anatomía de la planta. A pesar de los conocimientos adquiridos a través de estudios previos, aún hay muchas preguntas sin respuesta acerca del destino y el comportamiento de las NPs en las plantas. Por ejemplo, se desconoce el efecto de superficie o actividad superficial de NPs en la fitotoxicidad; también se desconoce la ruta de entrada a la planta y a los tejidos vasculares, así como el papel de las paredes celulares de las plantas en la internalización de las NPs. La necesidad más urgente es, probablemente, la construcción de conexiones entre las características de las nanopartículas (por ejemplo, el área superficial, tamaño de partícula y la actividad superficial) y la fitotoxicidad potencial, la cual podría incluso afectar el crecimiento y desarrollo de cultivos de importancia social, ambiental y económica.

II. ANTECEDENTES

2.1 El cultivo de maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie de América y es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen, pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género. El maíz cultivado es una planta completamente domesticada. El hombre y el maíz han vivido y han evolucionado juntos desde tiempos remotos, por tal motivo este cultivo tiene una gran importancia social, ambiental y económica [3].

2.1.1 Origen y descripción botánica

En México, centro de origen, domesticación y diversificación del maíz, existen 59 razas de maíz de acuerdo con la clasificación más reciente basada en características morfológicas e isoenzimáticas [4], que representan entre 20 y 27 % de las 220 a 300 razas de maíz existentes en el continente americano [5]. Esta diversidad es producto de milenarias prácticas agrícolas vinculadas al conocimiento tradicional de los pueblos indígenas de México, principales herederos, custodios y mejoradores del germoplasma nativo.

2.1.2 La planta: partes del maíz

La planta del maíz es de porte robusto de fácil desarrollo y de producción anual. Una parte importante del maíz es la raíz, la cual es la encargada de mantener a la planta erecta; el tallo, es erecto de elevada longitud pudiendo alcanzar los 4 metros de altura, es robusto y sin ramificaciones. El maíz es de inflorescencia monoica con inflorescencia masculina y femenina separada dentro de la misma planta que trabajan en conjunto para reproducir. En cuanto a la inflorescencia masculina, esta presenta

una panícula (espigón) de coloración amarilla que posee una cantidad muy elevada de polen, mientras que la inflorescencia femenina marca un menor contenido en granos de polen, y se forman en unas estructuras vegetativas denominadas espádices que se disponen de forma lateral. Por último los granos en la mazorca, cada uno es un fruto independiente llamado cariósipide que está insertado en el raquis cilíndrico u olote.

El desarrollo vegetativo del maíz comienza desde que se siembran las semillas hasta la aparición de los primeros brotes, entre 8 y 10 días, donde se ve muy reflejado el continuo y rápido crecimiento de la plántula. Para la normalización de las definiciones, los investigadores de maíz han elaborado una guía para identificar las diferentes etapas de esta planta (Figura 1), las cuales se dividen en dos grandes categorías [6]:

- Vegetativa (V)
- Reproductiva (R)

Además, las etapas de crecimiento se pueden agrupar en cuatro grandes períodos:

- 1) Crecimiento de las plántulas (etapas VE)
- 2) Crecimiento vegetativo (etapas V1... Vn)
- 3) Floración y la fecundación (etapas VT, R0, y R1)
- 4) Llenado de grano y la madurez (R6)

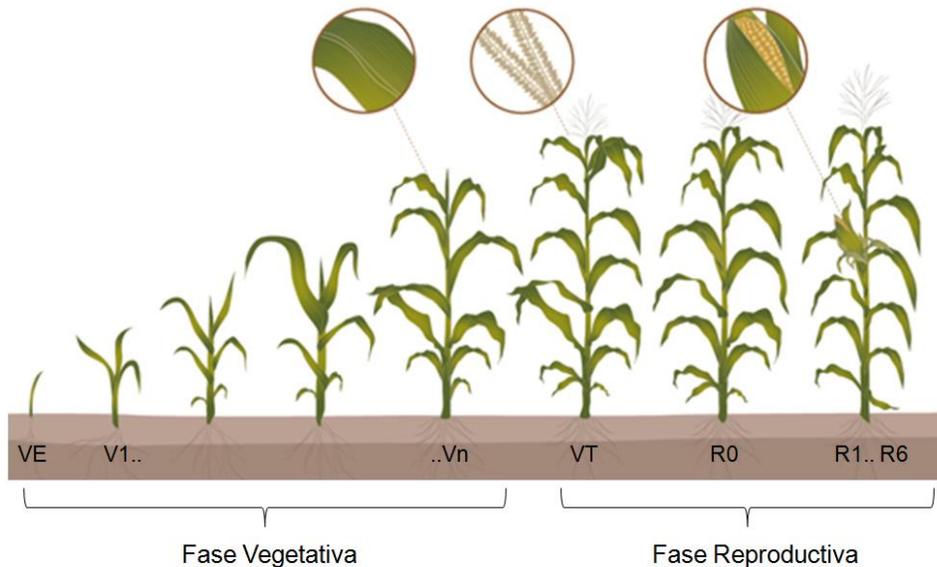


Figura 1. Etapas fenológicas del cultivo de maíz.

2.1.3 Usos del cultivo de maíz

El maíz tiene usos múltiples y variados, es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Las espigas jóvenes del maíz (maíz baby) cosechado antes de la floración de la planta es usado como hortaliza. Las mazorcas tiernas de maíz dulce son un manjar refinado que se consume de muchas formas. Las mazorcas verdes de maíz común también son usadas en gran escala, asadas o hervidas, o consumidas en el estado de pasta blanda en numerosos países [3].

2.1.4 Importancia social y ambiental del maíz

Desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, el maíz es el cultivo más importante de México [7], basta con decir que su consumo per cápita en México es aproximadamente 10 veces mayor que en Estados Unidos de América [8]. Este cereal cubre poco más de la mitad de la superficie agrícola sembrada, con aproximadamente 8

millones de hectáreas (principalmente en las zonas sub-húmeda tropicales, templado húmedas y sub-húmeda) [9], lo que representa el 67% del consumo de granos básicos. De esta superficie, 1.5 millones de hectáreas cuentan con riego, mientras que 6.5 millones de hectáreas es de temporal [10]. La fracción de tierras de temporal incluye 1.5 millones de hectáreas de buena a excelente calidad agrícola, 3.5 millones de hectáreas son de mediana calidad, y 1.5 millones de hectáreas son de calidad marginal [6].

La región sureste de México aporta alrededor de 25% de la producción total nacional (Figura 2); no obstante, los estados con mayores niveles de producción son Sinaloa (19.0 %), Jalisco (14.1 %), Estado de México (8 %), Chiapas (7.7 %), Guerrero (5.8 %), Guanajuato (5.6 %) y Veracruz (5.3 %). Con un enfoque empresarial, los dos primeros estados exportan parte de su producción, en tanto que el resto destinan gran parte de su producción al autoconsumo [11].



Figura 2. Producción regional promedio de maíz (2000-2011).

2.1.5 Maíz: variedad Antonio Narro (VAN-210)

En la agricultura del maíz se pueden realizar cruces tradicionales simples para realizar cultivos híbridos, esto se refiere a utilizar diferentes materiales, aprovechando el fenómeno de heterosis. La heterosis es el aumento en la expresión de ciertos caracteres (ej. rendimiento en grano) que se manifiestan en la cruce. De esta manera se aprovechan sus mejores características para la creación de una nueva variedad, que favorezca su desarrollo en una región específica [14]. La variedad de maíz VAN-210 fue creada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por medio de técnicas tradicionales de mejoramiento vegetal; a fin de obtener un cultivo adaptado al clima y suelo, entre otras características, del sureste de Coahuila. Esta variedad es de temporal y actualmente es comercializada.

2.1.6 Requerimientos agroecológicos del cultivo

El manejo racional de los factores climáticos de forma conjunta es fundamental para el desarrollo adecuado del cultivo. En la Tabla 1 se muestran algunos de estos requerimientos agroecológicos.

Tabla 1. Requerimientos agroecológicos del maíz [15].

Característica	Requerimiento
Temperatura óptima	18 y 21 °C
Textura del suelo	Franco-limoso
	Franco-arcilloso
	Franco-arcillo-limoso
Salinidad	< 7 dS m ⁻¹
pH óptimo	5.0 a 7.0

El maíz es una planta dotada de una amplia capacidad de respuesta a las oportunidades que ofrece el medio ambiente, sin embargo requiere de ciertas condiciones para un crecimiento y desarrollo óptimo, como pH, conductividad eléctrica, tipo de suelo, temperatura, humedad entre otras.

2.2 Nanociencia, nanotecnología y NPs

La nanociencia es un área emergente de la ciencia que se ocupa del estudio de los materiales de muy pequeñas dimensiones; a menudo se centra en la formación de nanopartículas [16]. La nanotecnología controla y reestructura la materia a nivel atómico y molecular en rangos de entre 1 y 100 nanómetros (nm), y aprovecha las distintas propiedades y fenómenos que ocurren a estas dimensiones, comparadas con aquellas propiedades de los materiales en grueso [17] (Figura 3). El propósito de la nanotecnología es el desarrollo de materiales, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones completamente nuevas [18].

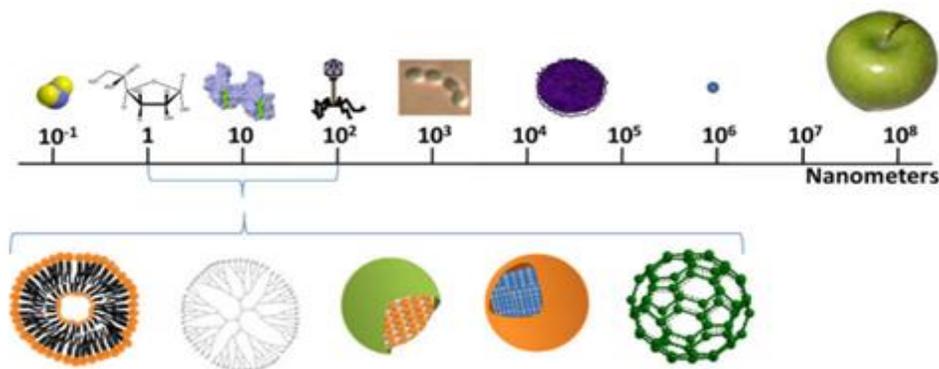


Figura 3. Tamaño de las NPs con respecto a macro partículas [19].

La síntesis de nanomateriales es un área creciente en investigación; en 2005 su desarrollo en el sector industrial fue de \$ 4 mil millones de dólares [20] y se anunciaba que en 2015 el mercado mundial para nanoproductos llegaría al billón de dólares [21, 22] y se proyecta que para

2020 alcance 3 billones de dólares [23]. Esto está relacionado con las propiedades únicas y el atractivo de las NPs para dar características específicas y deseables en los productos que las contengan [24].

2.2.1 Definiciones

Podemos definir nanopartícula como aquel material con un diámetro de 1 a 100 nm, que posea características distintivas proporcionadas básicamente por su área superficial y tamaño. Las NPs se pueden clasificar dependiendo de su origen en naturales o antropogénicas [25]. Al tener tamaños tan pequeños sus propiedades cambian con respecto a las que se tienen a escalas mayores, pudiendo ser aprovechadas para nuevas aplicaciones [26].

2.2.2 NPs de ZnO, TiO₂ y Fe₂O₃

Algunas de las NPs más utilizadas en los procesos industriales son los óxidos metálicos empleados principalmente en revestimientos, pinturas, pigmentos, electrónica y óptica, cosmética, energía, medio ambiente, entre otros. En 2010, la sílice, óxido de titanio, alúmina y óxidos de hierro y zinc dominaron el mercado en términos de flujo de masa a través de la economía mundial [27]. El volumen de producción de las NPs y su diversidad de aplicaciones ha crecido ampliamente en la última década y se proyecta que seguirá creciendo [28].

Guerrero *et al.*, mencionan que las NPs de óxidos metálicos presentan mejores propiedades eléctricas, ópticas, magnéticas, químicas y físicas en relación a las de sus homólogos. Dichas propiedades dependen de manera directa de los cambios estructurales que experimentan las partículas cuando están en la escala nanométrica [29].

Las NPs de óxidos metálicos pueden ser peligrosas para los seres humanos básicamente por dos razones: 1) su actividad catalítica, que puede interferir con numerosos procesos bioquímicos intracelulares, y 2) la eventual descomposición de las NPs en sus iones, los cuales podrían intervenir en la homeostasis intracelular, que es esencial para el metabolismo de la célula [30, 31]. El tamaño, forma, composición química, área específica y naturaleza química determinan las propiedades catalíticas de las NPs. El impacto de las NPs de óxidos metálicos en la salud está relacionado con sus propiedades, por lo que se deben desarrollar herramientas predictivas para la evaluación de riesgos [32].

El óxido de zinc es un material semiconductor relativamente barato con baja toxicidad, y muy efectivo en la protección contra rayos UV. Es un material excelente para la fabricación de pantallas solares, porque absorbe los rayos ultravioleta y combate los problemas potenciales asociados a la exposición al sol [33]. También se puede emplear en productos para el cuidado de la piel, en protectores solares, maquillaje, desodorantes, en recubrimientos de botellas y para el pulido de superficies [34].

Por otro lado, el dióxido de titanio es un semiconductor sensible a la luz que absorbe radiación electromagnética, principalmente en la región UV. Es un material químicamente estable y económico que tiene la posibilidad de que se aplique en diversas áreas [35]; aproximadamente la mitad de los estudios acerca de TiO_2 resultan con efectos toxicológicos [36]. El TiO_2 es uno de los semiconductores más investigados dentro de los procesos de oxidación avanzada debido a que posee propiedades fotoconductoras y fotocatalíticas que lo presentan como uno de los

óxidos de mayor impacto en la degradación de compuestos orgánicos clorados y en la oxidación de compuestos orgánicos volátiles.

La hematita (Fe_2O_3), es el principal mineral de hierro, el cual presenta gran utilidad en aplicaciones como pigmentos en diversos materiales y por sus propiedades magnéticas, es utilizado en áreas diversas como biofísica, medicina, ciencia de los suelos y astrofísica [37]. La incorporación de NPs de hierro en pinturas mejora el comportamiento de recubrimientos, evitando la disminución de su transparencia y de su brillo.

2.3 Presencia de NPs en el medio ambiente

Los nanomateriales están en el ambiente, debido a procesos naturales y antropogénicos [38]. El uso y producción de estos materiales ha incrementado exponencialmente. La producción global de NPs en 2010 fue de 290, 000 toneladas y se estima que entre 63 y 91 % terminó en vertederos (Figura 4) con un balance liberado en cuerpos de agua (0.4–7 %), suelos (8–28 %) y la atmósfera (0.1–1.5 %) [27].

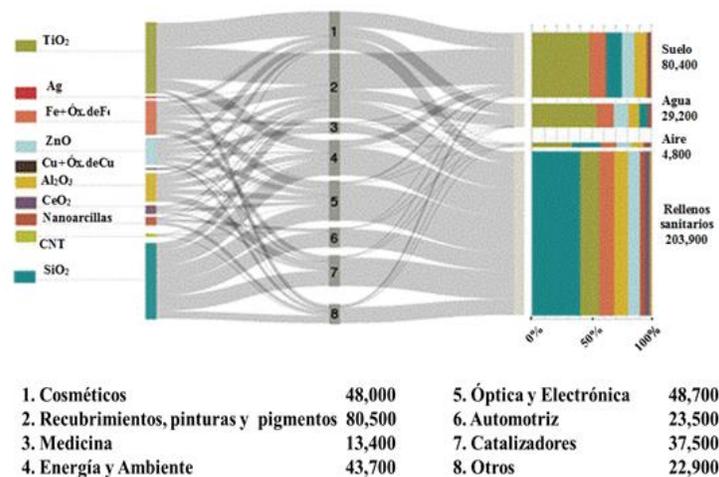


Figura 4. Flujo de NPs en 2010 (toneladas métricas año⁻¹) desde la manufactura hasta las aplicaciones y su eventual disposición.

Las NPs están implicadas en la producción de muchos productos para diferentes aplicaciones tales como cosmética, energía, automotriz, electrónica, entre muchas otras. El aumento en las aplicaciones de nanomateriales probablemente conducirá a una mayor probabilidad de exposición ambiental lo que incrementa la preocupación sobre la salud y seguridad de los seres vivos y los ecosistemas.

Es importante identificar los efectos causados por la exposición de NPs a nivel de moléculas, individuos o ecosistemas para determinar integralmente los riesgos potenciales. Sin embargo, hay pocas investigaciones que se enfocan en evaluar los impactos ambientales y la salud pública, en comparación con todos los hallazgos relacionados con la síntesis y posibles aplicaciones de las NPs [39]. Actualmente las NPs han entrado en la definición de contaminantes, esto al ver los riesgos potenciales que pueden causar. En el caso de los óxidos metálicos, estos podrían contaminar debido su disolución y la posterior liberación de iones metálicos tóxicos al medio ambiente, acumulándose en el suelo y en los sedimentos durante mucho tiempo a través de varias vías, incluida la eliminación de los efluentes líquidos y la deposición atmosférica [40].

La contaminación ambiental se incrementa día a día debido a la urbanización, industrialización y estilos de vida de la gente, por lo que la liberación y contaminación por NPs se puede volver una amenaza y un constante desafío para los organismos y ecosistemas [41]. Por esta razón es importante desarrollar un modelo científico predictivo para entender cómo las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales pueden causar la liberación y propagación de estos al medio ambiente, causando su acumulación y desequilibrios en los niveles tróficos,

pudiéndose dar resultados potencialmente peligrosos a nivel de organismo y ecosistemas [42].

2.3.1 Transformación de las NPs en el medio ambiente

En el medio ambiente las NPs se encuentran en un ambiente físico y químico cambiante y esto hace que se alejen de su estado normal, hacia productos y destinos que se desconocen en gran medida. Estos cambios dependen de las condiciones a las que están expuestas (pH, estados de oxidación, contenido de materia orgánica, entre otros) e incluso pequeños cambios en los sistemas pueden conducir a diferentes comportamientos y transformaciones [43]. Una de las principales interacciones del ser humano con el medio ambiente se da con el aire, el cual puede transportar NPs debido a su peso y tamaño, por lo que las NPs pueden viajar grandes distancias e interactuar con otros contaminantes, generando efectos indeseables en el medio ambiente y la salud humana [44].

Las características físicas y químicas de las NPs son importantes en cuanto a su toxicidad en los biosistemas, algunas de estas son: 1) tamaño; 2) composición elemental; 3) área específica; 4) porosidad; 5) porcentaje de átomos en la superficie y 6) diámetro hidrodinámico [11].

Zhao *et al.* realizaron estudios sobre el efecto de NPs de ZnO sobre el cultivo de maíz, en los que encontraron que estas reducen significativamente el tamaño de la raíz y la producción de biomasa; también encontraron Zn en los tejidos y una reducción significativa de la actividad de las enzimas catalasa y peroxidasa, lo que podría indicar daño en el sistema de defensa [45].

La observación directa de las NPs en la superficie de plantas y en tejidos se ha hecho posible por medio de nuevos métodos, haciendo uso de puntos cuánticos y tecnologías de microscopía novedosas. Lo anterior son estudios puntuales sobre la localización de las partículas en las plantas [46].

2.3.2 Toxicidad de las NPs

La ausencia de conocimiento sobre los efectos resultantes de las nuevas propiedades exhibidas por las NPs ha hecho que surja la preocupación de evaluar los riesgos potenciales de estos materiales, llevando a un incremento en la investigación sobre el potencial tóxico de las NPs al medio ambiente y salud de los seres vivos. Se ha desarrollado un campo de investigación especial para evaluar la toxicidad de los nanomateriales: la nanotoxicología, esta disciplina se encarga de determinar las consecuencias negativas asociadas a la producción y uso de la nanotecnología [47].

Se sabe que los materiales que a tamaños normales son inocuos, a escala nanométrica pueden ser tóxicos debido a que tienen diferentes propiedades como: elevada área específica y tamaño más pequeño. Ambas características causan cambios en sus propiedades fisicoquímicas; pudiendo tener efectos negativos para el medio ambiente y otros organismos [48]. El aumento del área específica de las NPs produce mayor número de átomos en la superficie, lo que podría aumentar la reactividad de la partícula y por ende elevar la toxicidad.

Existe evidencia de que las NPs pueden entrar en contacto con los organismos vivos e interrumpir su actividad normal y llevarlos a un mal funcionamiento o enfermedades. Las NPs son capaces de atravesar membranas biológicas para entrar a las células, tejidos y órganos que

partículas normales no podrían [49]. La parte aérea de la planta facilita la interacción con las NPs por lo que estas son absorbidas en la superficie a través de sus aberturas, sin embargo esto depende del tamaño de las NPs [50].

Estudios recientes han demostrado que las NPs se pueden acumular en plantas vasculares. Geisler *et al.* observaron acumulación de NPs de Ag en *Arabidopsis thaliana* L., dando evidencias de la interacción de estos materiales con los diversos órganos de las plantas [51]. Wang *et al.* evaluaron la acumulación y transporte de NPs de CuO en el maíz y concluyeron que las NPs de CuO están en contacto con los diversos órganos de las plantas [52].

En algunos peces se ha visto efecto de las NPs en el número y la variación de estas especies, así como en su comportamiento, fisiología y bioactividad. Las NPs de hierro causan la peroxidación de lípidos en el hígado y corazón del bagre africano [53]. También se ha observado un aumento de las especies reactivas de oxígeno en embriones de pez cebra expuestos a NPs de ZnO [54]. Estos nanomateriales pueden provocar graves efectos sobre medios acuáticos por lo que se sugiere limitar su uso en estos ecosistemas [55].

La información toxicológica del material en escala normal puede servir como base para las estimaciones preliminares sobre la toxicidad de una NP, junto con los estudios toxicológicos *in vivo* e *in vitro* y los estudios epidemiológicos. Los principales factores que pueden determinar los efectos toxicológicos de los nanomateriales en el organismo son [56]: 1) dependientes de la exposición (vía de penetración, duración, concentración), 2) dependientes del organismo expuesto (susceptibilidad individual, realización de una actividad física en el lugar de trabajo, lugar

de depósito, ruta que siguen las NPs una vez que se han introducido en el organismo), y 3) factores relacionados con los nanomateriales (toxicidad intrínseca de la sustancia).

Principales vías de penetración de las NPs [57]:

- 1) Vía inhalación: Los nanomateriales inhalados, dependiendo de su tamaño, forma y composición química son capaces de penetrar y depositarse en el aparato respiratorio. En estudios realizados en ratas se ha observado que los nanomateriales pueden depositarse en la región nasal y tienen la capacidad para trasladarse hasta el cerebro a través del nervio olfativo.
- 2) Vía dérmica: No se han descrito efectos específicos para la salud relacionada con la exposición dérmica a partículas ultra finas, aunque hay estudios que sugieren que este tipo de partículas pueden penetrar a través de los poros o folículos pilosos, en donde pueden llegar a disolverse.
- 3) Vía digestiva: Esto puede ser posible por malas prácticas higiénicas durante el manejo de los materiales, sin embargo, tampoco se han descrito efectos específicos para la salud relacionados con la ingestión de NPs.

2.4 Efecto de NPs en los cultivos

Los cultivos podrían transferir NPs entre varias especies en la cadena alimenticia dado que son consumidas por los organismos de niveles tróficos bajos, así como por animales y personas. La literatura actual revela que todas las interacciones NPs-Planta dependen de la especie de la planta, así como del tipo, tamaño, composición química, estabilidad y funcionalización de la NPs. Se ha demostrado que ciertos nanomateriales artificiales podrían ejercer toxicidad química o física en las plantas [58].

El límite de tolerancia de las NPs metálicas juega un papel clave en el desarrollo de plantas [59]. Si las plantas absorben en exceso metales, los efectos tóxicos se pueden hacer presentes a través de la disminución del crecimiento e irregularidades en la división celular [60, 61, 62]. Por otro lado, las NPs metálicas pueden actuar como co-factor de enzimas implicadas en la formación de metabolitos intermedios. Sin embargo, la respuesta de las plantas a NPs metálicas varía con la naturaleza del metal, el tipo de especies de plantas y la etapa de crecimiento.

Algunos de los efectos negativos de las NPs son: acumulación en tejidos, disminución del crecimiento y rendimiento de la planta y afectación de la fijación biológica de nitrógeno [63]. La mayoría de los estudios publicados sobre toxicidad de NPs en plantas han abordado parámetros como la tasa de germinación y las características relacionadas con el crecimiento.

Se ha demostrado que las NPs de 10 a 50 nm están biodisponibles para las plantas. Sin embargo, las NPs pueden estar más biodisponibles para algunas plantas que para otras, aún en las mismas condiciones [64].

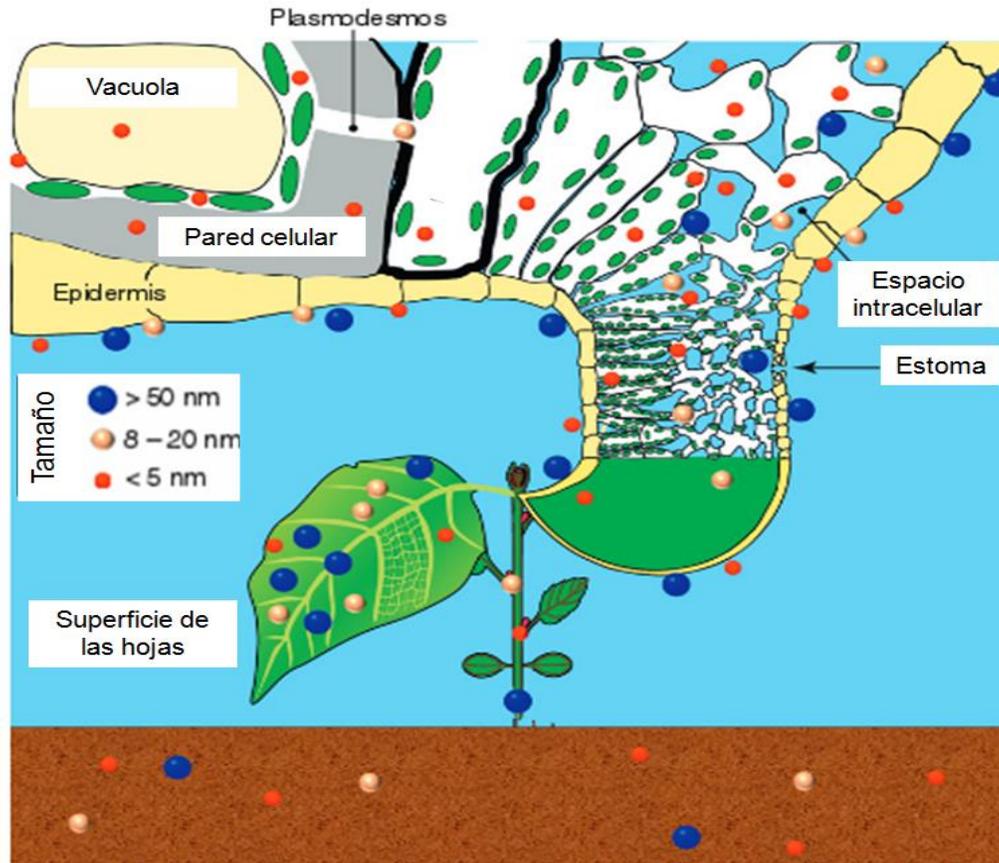


Figura 5. Distribución de NPs de tres tipos de tamaños diferentes en los brotes a nivel de órganos, tejidos y paredes celulares [36].

Las NPs entran por la superficie de la planta y se introducen parcialmente al espacio intracelular, mientras que sólo las NPs más pequeñas llegan hasta la pared celular y pueden entrar a la vacuola (Figura 5).

Las posibles rutas para la absorción de las NPs van desde su ingreso, atravesando la superficie de la cutícula de las hojas, por algunas partes de la planta (flores), por raíces o por heridas [65].



Figura 6. Dinámica teórica de las NPs en el suelo [66].

La Figura 6 muestra las posibilidades interacciones de las NPs en el suelo; sin embargo estas no son bien conocidas.

A la fecha se ha observado que las NPs afectan diferencialmente a las plantas. Las especies más frecuentemente utilizadas en estudios de toxicidad de NPs incluyen el pepino (*Cucumis sativus* L.), la lechuga (*Lactuca sativa* L.), la col (*Brassica oleracea* L.) y el maíz (*Zea mays* L.); mientras que las NPs más frecuentemente probadas son las que se producen en mayor cantidad, como lo son, nanotubos de carbón, nano-ZnO, nano-Al₂O₃ y nano-TiO₂.

En un experimento en el que se emplearon suspensiones coloidales de TiO₂-NPs (30 nm de diámetro) y bentonita, una arcilla natural, se determinó que estas causaron que el tamaño de poro de la pared celular de las raíces del maíz disminuyera de 6.6 a 3 nm e inhibieron la conductividad de agua, por lo tanto la transpiración de las plantas se vio afectada, mientras que la tasa de crecimiento disminuyó 10 % [67].

El grafeno inhibió el crecimiento del cultivo de col (*Brassica oleracea* L.) y redujo su producción de biomasa [68]. Por otro, ensayos con la misma especie de col, aplicando nano tubos de carbón, no mostraron efecto significativo en la germinación de semillas, elongación de la raíz, biomasa seca y estrés oxidativo en la hojas [69]. Nanopartículas de plata aplicadas a soya (*Glycine max* L. Merr) disminuyeron la producción de frutos y bajaron los niveles de clorofila en las plantas [70]. Adicionalmente, se ha reportado que las NPs de ZnO disminuyen el índice mitótico en ajo (*Allium sativum* L.) [71]. Este mismo efecto se ha observado en cebolla (*Allium cepa* L.) por la aplicación de NPs de Ag [72]. Por otro lado, las NPs de Ag mejoraron las características vegetativas y propiedades fotoquímicas del *Borago officinalis* L. [73]. Otros efectos de inhibición han sido reportados con NPs de CeO₂ en alfalfa (*Mendicago sativa* L.), donde inhibieron la germinación de las semillas, así como la producción de la biomasa en las etapas de crecimiento [74].

III. JUSTIFICACIÓN

La producción mundial y el uso de NPs para su aplicación en diversas áreas como cosméticos, pinturas, electrónica, industria automovilísticas, entre otras, se ha incrementado constantemente a índices de 25 % anual, con inversiones que han alcanzado los 15 mil millones de dólares anuales [75]. Las NPs de SiO_2 , Al_2O_3 , ZnO , TiO_2 y Fe_2O_3 son de las más utilizadas en estos procesos [76]. Keller *et al.* estiman que casi el 50 % de las NPs producidas terminan en suelos, cuerpos de agua o aire, facilitando su entrada a plantas y otros organismos [27]. Gottschalk *et al.* en 2009 plantearon que las concentraciones de NPs en sedimentos aumentarían entre 2008 y 2012 de 0.2 a 0.6 mg kg^{-1} para el TiO_2 , de 1.8 a 5.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ZnO , de 0.7 a 2.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para nano-Ag, y de 0.2 a 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para nanotubos de carbono [77]. Actualmente existe preocupación sobre la absorción, translocación y acumulación de las NPs en cultivos alimenticios, sin embargo, hay muy poca información al respecto [39]. Con base en lo anterior y considerando la importancia social, económica y ambiental del maíz, es importante conocer los efectos que las NPs tienen sobre la germinación, crecimiento y desarrollo de este cultivo.

IV. HIPÓTESIS

Las NPs de ZnO , TiO_2 y Fe_2O_3 alteran el crecimiento y desarrollo del maíz cultivado en condiciones de invernadero.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las NPs de ZnO, TiO₂ y Fe₂O₃ sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de maíz (*Zea mays* L.).

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la germinación de semillas de maíz acondicionadas con concentraciones crecientes de NPs.
2. Caracterizar la acumulación de biomasa del maíz cultivado en invernadero e irrigado con suspensiones de NPs.
3. Estudiar las alteraciones fisiológicas (concentración de clorofila) del cultivo de maíz inducidas por la aplicación de NPs.
4. Identificar las alteraciones fenológicas del cultivo
5. Determinar los cambios en los componentes de rendimiento del maíz favorecidos por la aplicación de NPs.

VI. METODOLOGÍA CIENTÍFICA

6.1 Experimento en laboratorio (prueba de germinación)

6.1.1 Materiales e infraestructura

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio Interacciones Planta-Ambiente de Cinvestav, Unidad Saltillo; las pruebas de germinación se realizaron en una incubadora con agitación orbital. La semilla fue proporcionada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) a través del Instituto Mexicano del Maíz. En esta investigación se empleó la Variedad Antonio Narro 210 (VAN-210) de la cosecha 2013. Para el experimento se utilizaron tres diferentes NPs comerciales:

Óxido de zinc (ZnO, < 50 nm, CAS 1314-13-2)

Dióxido de titanio (TiO₂, < 50 nm, CAS 1317-70-0)

Óxido de hierro (Fe₂O₃, < 50 nm, CAS 1309-37-1)

En la Tabla 2 se presenta una descripción de las NPs, mismas que se compraron a la empresa “*Materiales Nanoestructurados S.A. de C.V.*”.

Tabla 2. Características de las NPs que se utilizaron en los experimentos.

Característica	Nanopartícula		
	Óxido de zinc	Dióxido de titanio	Óxido de hierro
Fórmula molecular	ZnO	TiO ₂	α-Fe ₂ O ₃
Estructura cristalina	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal
Peso molecular	81.400	79.866	159.690
Color	Hueso	Blanco	Rojo ocre

6.1.2 Tratamientos

Se utilizaron suspensiones de NPs (3.0 y 6.0 gL⁻¹) de cada una de las NPs y el control fue agua destilada estéril. En la Tabla 3 se resumen los tratamientos usados en el ensayo de germinación, el procedimiento se describe en el Anexo 1.

Tabla 3. Tratamientos del experimento de germinación de maíz.

Nanopartícula	Concentración (gL ⁻¹)	Clave
ZnO	3.0	Zn-3
ZnO	6.0	Zn-6
TiO ₂	3.0	Ti-3
TiO ₂	6.0	Ti-6
Fe ₂ O ₃	3.0	Fe-3
Fe ₂ O ₃	6.0	Fe-6
Control	-	Ctrl

En la Figura 7 se esquematiza la distribución de las unidades experimentales (UE) de las pruebas de germinación; se llevaron a cabo cuatro réplicas cada una con 25 semillas de maíz para dar un total de 100 semillas por tratamiento (se realizó por triplicado). Esto por lo recomendado por la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (*International Seed Testing Association*) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2014) en el manual para el análisis de calidad de semillas para la siembra.

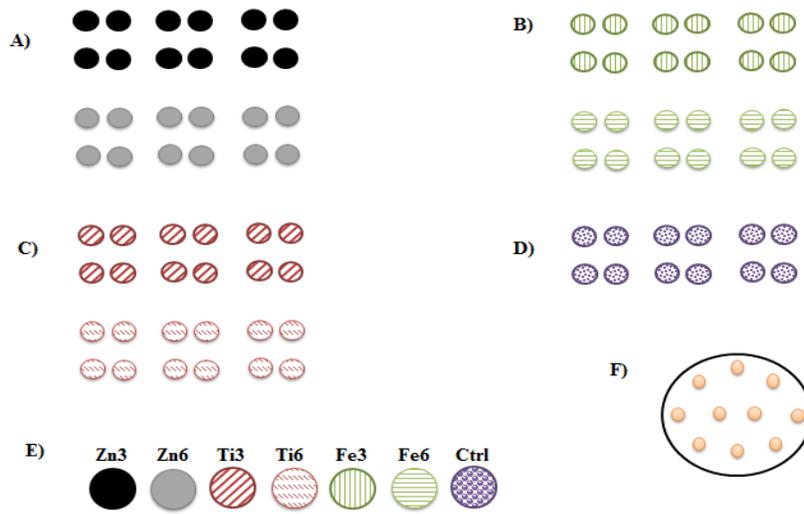


Figura 7. Distribución de las unidades experimentales (UE) para las pruebas de germinación. A: Zn-3 y Zn-6; B: Ti-3 y Ti-6; C: Fe-3 y Fe-6; D: Control; E: Colores de los tratamientos; F: Distribución de semillas en el interior de cada unidad experimental.

6.1.3 Diseño experimental y modelo estadístico

Por las características y homogeneidad del experimento, se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se montaron para cada tratamiento tres repeticiones, dándonos un total de 84 unidades experimentales (Figura 7). Las cajas de Petri fueron distribuidas al interior de una cámara de incubación (Vichi de México, Modelo INO 650M) y se mantuvieron a una temperatura de 25 °C (± 5 °C) durante siete días.

El diseño completamente al azar, X_{ij} se puede representar por el modelo:

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, n_j \\ j = 1, 2, \dots, k \end{cases}$$

Dónde:

μ = media general

τ_i = efecto del tratamiento i

ε_{ij} = error experimental para cada observación (ij)

6.1.4 Unidades experimentales

El método por el cual se evaluó el porcentaje de germinación es el planteado por la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas [78]. El experimento se realizó en cajas Petri acondicionadas con base en el manual de calidad de la semilla de la SAGARPA [79], a cada caja Petri se le colocaron 25 semillas de maíz y se añadieron 10 mL de la suspensión de NPs correspondiente y en el caso del control se agregaron 10 mL de agua destilada previamente esterilizada. Posteriormente se incubaron por siete días en una incubadora con agitación orbital.

6.1.5 Caracterización de la germinación

Se midieron variables como porcentaje de germinación, peso fresco y seco de las plántulas. A los cuatro días se realizó una evaluación preliminar de las plántulas germinadas, posteriormente, a los siete días se hizo el conteo final de semillas que germinaron y formaron plántulas normales y semillas sin germinar. Se obtuvo el porcentaje de germinación con base en el promedio de las repeticiones, el porcentaje mínimo de germinación debe de ser de 85 % [80].

Los resultados se expresaron en porcentaje de plántulas normales. A los siete días también se realizó la determinación del peso fresco de la plántula, posteriormente se cortaron y pesaron los cotiledones, epicótilos e hipocótilos de la plántula contenidas en cada unidad experimental. Para la determinación del peso seco las muestras se deshidrataron a 70 °C por 72 h. El mismo procedimiento se realizó para las semillas no germinadas.

6.2 Experimento en invernadero (cultivo de maíz)

6.2.1 Materiales e infraestructura

El experimento de cultivo de maíz se realizó en un invernadero tipo capilla a dos aguas (8x24x3.75 m), ubicado en las instalaciones del Cinvestav Unidad Saltillo en Ramos Arizpe, Coahuila. Con las siguientes coordenadas, 25°33'52.28" N, 100°56'14.83" W y una altitud de 1386 msnm, a una temperatura anual media de 20 °C y una precipitación media anual de 400 mm [81]. La semilla de maíz VAN-210 de la cosecha 2014, fue proporcionada por la UAAAN a través del Instituto Mexicano del Maíz. Para el experimento se utilizaron tres diferentes NPs comerciales:

Óxido de zinc (ZnO, < 50 nm, CAS 1314-13-2)
Dióxido de titanio (TiO₂, < 50 nm, CAS 1317-70-0)
Óxido de hierro (Fe₂O₃, < 50 nm, CAS 1309-37-1)

En la Tabla 4. se presenta una descripción de las NPs, mismas que se compraron a la empresa “*Materiales Nanoestructurados S.A. de C.V.*”.

Tabla 4. Características de las NPs que se utilizaron en los experimentos.

Característica	Nanopartícula		
	Óxido de zinc	Dióxido de titanio	Óxido de hierro
Fórmula molecular	ZnO	TiO ₂	α-Fe ₂ O ₃
Estructura cristalina	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal
Peso molecular	81.400	79.866	159.690
Color	Hueso	Blanco	Rojo ocre

Las características de cada suelo dependen de varios factores. Los más importantes son el tipo de roca que los originó, su antigüedad, el relieve, el clima, la vegetación y los animales que viven en él, además de las modificaciones causadas por la actividad humana.

El suelo fue proporcionado por el Departamento de Suelos de la UAAAN, el muestreo se realizó en las instalaciones de la institución indicada la cual está ubicada en la Calzada Antonio Narro #1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila. Con coordenadas geográficas a $25^{\circ} 21' 20''$ de latitud norte y $101^{\circ} 01' 30''$ de longitud oeste y a una altitud de 1743 m. En la Figura 8 se muestra una imagen satelital del área total muestreada.



Figura 8. Vista aérea del área de muestreo

Se obtuvieron las muestras de suelo mediante una toma dirigida, de cada uno de los tres sitios. Se preparó una muestra compuesta para generar un total de tres muestras compuestas (S1, S2 y S3), con base en el

método establecido por Fernández-Luqueño *et al.* [82] y siguiendo las recomendaciones de la USDA [83] Posteriormente las muestras fueron secadas en condiciones ambientales para su posterior tamizado con una malla de 0.5 cm.

6.2.2 Tratamientos

Se prepararon suspensiones en concentraciones de 3.0 y 6.0 gL⁻¹ de cada una de las NPs descritas; el control fue regado con agua potable (Tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos usados en los experimentos de invernadero.

Nanopartícula (NPs)	Concentración (gL ⁻¹)	Clave
ZnO	3.0	Zn-3
ZnO	6.0	Zn-6
TiO ₂	3.0	Ti-3
TiO ₂	6.0	Ti-6
Fe ₂ O ₃	3.0	Fe-3
Fe ₂ O ₃	6.0	Fe-6
Control	-	Ctrl

Las suspensiones se emplearon para regar el cultivo de maíz hasta obtener una concentración final de 200 mg de NPs kg⁻¹ suelo y 400 mg de NPs kg⁻¹ suelo respectivamente. Los días después de la siembra (DDS) a los que se regó o fertilizó cada unidad experimental se describen en el Anexo 5. En la Tabla 5 se resumen los tratamientos utilizados para los riegos del maíz durante el ensayo de invernadero. En el invernadero

de la unidad se realizó la distribución de las unidades experimentales. En la Figura 9 y 10 se muestran los acomodos aleatorios de las unidades experimentales del ensayo de invernadero en los diferentes tiempos de corte.

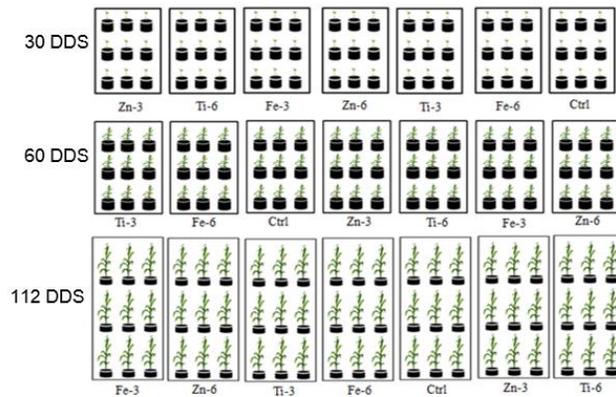


Figura 9. Distribución de los tratamientos del experimento del cultivo de maíz; S1, S2 y S3= muestras de suelo compuestas, réplica 1. La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 2.

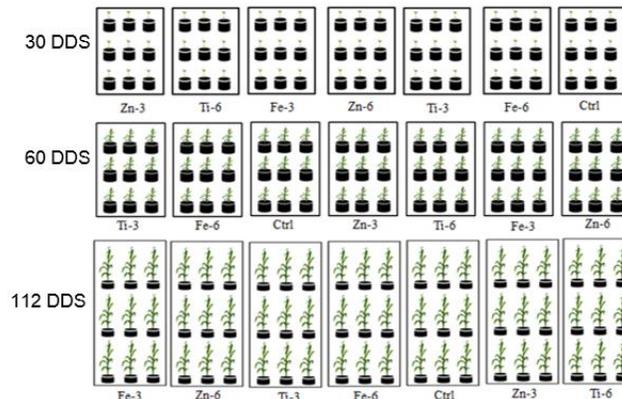


Figura 10. Distribución de los tratamientos del experimento del cultivo de maíz; S1, S2 y S3= muestras de suelo compuestas, réplica 2. La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 2.

6.2.3 Diseño experimental y modelo estadístico

El desarrollo del ensayo en invernadero tenía variabilidad entre las unidades experimentales, por ello se escogió un diseño de bloques completamente al azar. Se asignaron de manera aleatoria los tratamientos (Tabla 5) en bloques, cada uno de ellos con nueve unidades experimentales (tres de cada muestra de suelo) dando un total de 189 unidades experimentales. Todo el experimento en invernadero se repitió dos veces, por lo que se montaron 378 unidades experimentales durante el desarrollo del experimento.

En el diseño de bloques al azar, una observación X_{ij} se puede representar por el modelo:

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{cases}$$

Dónde:

μ = media general

τ_i = efecto del tratamiento i

β_j = efecto del bloque j

ε_{ij} = error experimental para cada observación (ij)

6.2.4 Unidades experimentales

Luego de muestrear y caracterizar el suelo se montaron las unidades experimentales. Ciento ochenta y nueve bolsas tipo vivero (35 x 40 x 400 cm) se llenaron con 6.0 kg del suelo. En cada bolsa tipo vivero se colocaron 3 semillas de maíz uniformemente distribuidas a una profundidad de 3 a 5 cm. Las unidades experimentales se colocaron en bloques de 9 unidades experimentales, cada bloque incluye tres bolsas del cultivo de cada uno de los tres sitios (S1, S2 y S3). El cultivo se regó

con el tratamiento correspondiente en las concentraciones mencionadas (3 y 6 g L⁻¹) en el caso del control el riego fue con agua potable. Las fechas de riego se definieron en función de las necesidades de cada unidad experimental, pero cada unidad experimental recibió la misma cantidad de suspensión (200 mL) el mismo día de riego (a la siembra y al día 35 después de la siembra). Los muestreos fueron destructivos y se realizaron a los 30, 60 y 112 DDS. Para la réplica 2 del experimento completo se siguió el mismo procedimiento.

6.2.5 Caracterización fisicoquímica del suelo

Se determinó el pH, conductividad eléctrica (CE) y tamaño de partícula del suelo. El tamaño de partícula se determinó mediante el protocolo descrito por la USDA puntualizado en el Anexo 2 [84]. Las pruebas de pH se realizaron en una relación 1: 2.5 suelo/ H₂O (m/m) y se leyeron utilizando el Thermo Scientific Orion Star A211, Orion 8302BNUMD ROSS® Ultra pH/ATC Triode® equipado con un electrodo de vidrio según la técnica descrita en el Anexo 3 [85]. La CE se determinó con el equipo Thermo Scientific Orion Star A212, Orion 013005MD Conductivity Cell. La relación de suelo/H₂O fue de 1:2 (m/m) y la técnica se realizó de acuerdo con Rhoades *et al.* Este procedimiento es descrito en el Anexo 4 [86].

6.2.6 Caracterización del crecimiento y desarrollo del cultivo

6.2.6.1 Biomasa

Al llegar al día de muestreo (30, 60 y 112 días después de la siembra) se seleccionaron aleatoriamente cada una de las 9 unidades experimentales de cada uno de los tratamientos (óxido de zinc, dióxido de titanio, óxido de hierro y control) de ellas se obtuvo la planta completa de la cual se

dividió en parte aérea y raíz, a estas se les determinaron sus longitudes, así como peso fresco y seco.

6.2.6.2 Fisiología

Una herramienta común para la determinación del contenido de pigmentos es mediante el medidor de clorofila *in situ* SPAD, este provee sólo un índice del contenido de pigmentos de la hoja. Las unidades SPAD se evaluaron con un medidor de clorofila Minolta/SPAD-502 Plus (Konika Minolta Sensing., Spectrum Technologies, Inc) según la técnica descrita en 1995 por Markwell *et al.* [87], la medición se realizó 3 veces por semana.

6.2.6.3 Fenología

Después de la siembra se monitoreó diariamente el cultivo hasta que se observó cada una de las etapas fenológicas del cultivo, etapas como el estado de emergencia, floración masculina, floración femenina y madurez fisiológica.

6.2.6.4 Componentes de rendimiento a la cosecha

Al alcanzar la madurez (112 DDS) se determinó el peso en fresco y peso seco de la parte aérea y de la raíz; y se registraron variables del fruto, como el peso de semillas.

6.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del ensayo de germinación se sometieron a una prueba de normalidad por el método de “Shapiro-Wilk normality test”, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), esto con la ayuda del software R® versión Rx642.14.0 para Windows. Los ensayos de invernadero (cultivo de maíz) se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), esto con la ayuda del software SAS®.

VII. RESULTADOS

7.1 Ensayo de germinación

7.1.1 Suspensiones de NPs

Al momento de montar los experimentos en laboratorio y en invernadero se determinó el pH y la CE de cada una de las suspensiones con NP. Las nanopartículas, así como la concentración de estas modificaron el pH y la CE, comparadas con el control (Tabla 6).

Tabla 6. Caracterización de las suspensiones empleadas para tratar semillas o plantas de maíz en condiciones de laboratorio o invernadero.

Tratamientos ^{††}	Concentración (g L ⁻¹)	pH	CE (dS m ⁻¹)
Zn-3	3 [£]	7.57	0.17
Zn-6	6	7.77	0.11
Ti-3	3	6.32	0.19
Ti-6	6	6.24	0.22
Fe-3	3	12.07	4.80
Fe-6	6	12.66	11.58
Ctrl	-	6.89	0.30

^{††} La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 2.

[£] n=6 (dos fechas de preparación de suspensión × triplicado).

7.1.2 Germinación

El porcentaje de germinación de semillas de maíz fue estadísticamente igual en todos los tratamientos *i.e.* el tipo o concentración de NP no modificó significativamente la germinación. Durante todo el experimento el porcentaje de germinación varió del 93 al 97 % (Figura 11).

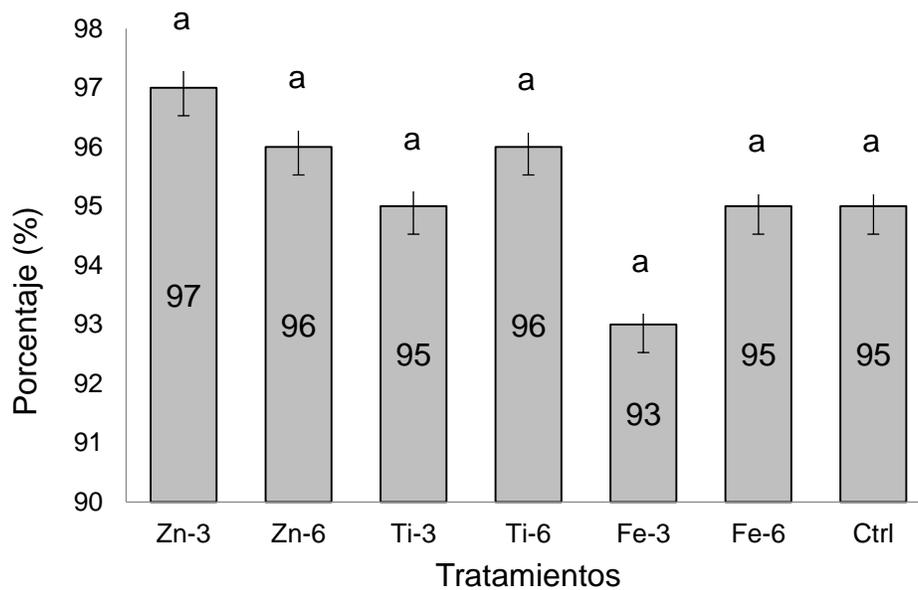


Figura 11. Porcentaje de germinación de semillas de maíz, determinado en condiciones de laboratorio. La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 2. n=12 (4 cajas Petri x triplicado).

Las NPs de ZnO incrementaron significativamente el número de plántulas normales, comparado con las NPs de Fe₂O₃, a 3 gL⁻¹ (Tabla 7). Sin embargo, el número de plántulas normales en todos los tratamientos fue estadísticamente igual al tratamiento control (Tabla 7).

Con el tratamiento de TiO₂ a 3 gL⁻¹ el peso fresco total de plántulas de maíz disminuyó estadísticamente de forma significativa un 11 %,

comparado con las plántulas tratadas con NPs de ZnO o con Fe₂O₃ a concentraciones de 3 gL⁻¹. Sin embargo, ninguna de las NPs empleadas afectó significativamente el peso fresco total de las plántulas, comparado con el tratamiento control (Tabla 7).

Los tratamientos con las claves Zn-3, Ti-6 y Fe-6 aumentaron significativamente el peso seco total de plántulas, con respecto a los tratamientos Zn-6 y Ti-3. Los tratamientos con NPs no alteraron significativamente el peso seco de las plántulas, en comparación con el control (Tabla 7).

Tabla 7. Características de las plántulas de maíz tratadas durante siete días con diferentes dosis y tipos de NPs.

Tratamientos [¶]	Plántulas normales (unidades) [£]	Peso fresco total (g)	Peso seco total (g)
Zn-3	24.16 ^{a, μ}	18.71 ^a	6.33 ^a
Zn-6	24.08 ^a	18.53 ^a	5.88 ^b
Ti-3	23.75 ^{ab}	16.74 ^b	5.84 ^b
Ti-6	23.91 ^{ab}	17.53 ^{ab}	6.35 ^a
Fe-3	23.16 ^b	18.34 ^a	6.23 ^{ab}
Fe-6	23.83 ^{ab}	17.34 ^{ab}	6.29 ^a
Ctrl	23.75 ^{ab}	17.68 ^{ab}	6.05 ^{ab}

[¶] La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 5.

[£] Se colocaron 25 semillas de maíz por cada caja Petri empleada.

^μ Letras iguales en cada columna representan igualdad estadística (Tukey, $\alpha = 0.05$); n=12, (4 cajas Petri x triplicado).

Las NPs empleadas afectaron significativamente algunas características de las plántulas. Las NPs de Zn, a ambas concentraciones, y las de Fe₂O₃ a 3 gL⁻¹ incrementaron significativamente el peso fresco del epicótilo, comparado con los tratamientos control, Ti-3 y Ti-6 (Tabla 8), mientras que las NPs de Ti y Fe a 3 gL⁻¹ disminuyeron significativamente el peso fresco de los cotiledones, comparado con los tratamientos control, Zn-3 y Ti-6. Las NPs de Ti a 3 gL⁻¹ disminuyeron significativamente el peso seco del hipocótilo con respecto al tratamiento control. El peso fresco del hipocótilo y el peso seco del epicótilo y de los cotiledones no fueron modificados significativamente por el tipo o concentración de NPs, comparado con el control (Tabla 8).

Tabla 8. Peso fresco y seco de secciones de 25 plántulas de maíz tratadas durante siete días con diferentes dosis y tipos de NPs.

Tratamientos ^{††}	Peso fresco(g)			Peso Seco (g)		
	Epicótilos	Hipocótilos	Cotiledones	Epicótilos	Hipocótilos	Cotiledones
Zn-3	4.53 ^{a,μ}	3.83 ^{ab}	9.39 ^a	0.51 ^a	0.75 ^{bc}	4.84 ^{ab}
Zn-6	4.56 ^a	3.92 ^a	8.96 ^{abc}	0.48 ^a	0.76 ^{bc}	4.44 ^b
Ti-3	3.72 ^c	3.12 ^c	8.59 ^{cd}	0.48 ^a	0.66 ^c	4.45 ^b
Ti-6	3.57 ^c	3.39 ^{abc}	9.43 ^a	0.48 ^a	0.79 ^{ab}	4.89 ^a
Fe-3	4.60 ^a	3.27 ^{bc}	8.41 ^d	0.45 ^a	0.90 ^a	4.46 ^b
Fe-6	4.46 ^{ab}	3.21 ^{bc}	8.65 ^{bcd}	0.47 ^a	0.81 ^{ab}	4.75 ^{ab}
Ctrl	3.79 ^{bc}	3.51 ^{abc}	9.16 ^{ab}	0.44 ^a	0.81 ^{ab}	4.59 ^{ab}

^{††} La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 5.

^μ Letras iguales en cada columna representan igualdad estadística (Tukey, $\alpha = 0.05$); n = 12, (4 cajas Petri x triplicado).

7.2 Ensayo en invernadero

7.2.1 Suelo

Se realizó la caracterización del suelo, en donde se evaluó pH, CE, textura y distribución de tamaño de partícula (Tabla 9). Todas las características de suelo fueron estadísticamente iguales entre sitios de muestreo.

Tabla 9. Caracterización de los tres suelos muestreados en la misma parcela y empleados en el experimento de invernadero.

Característica	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3
pH	8.63 ^{a,μ}	8.76 ^a	8.63 ^a
CE(μS/cm)	548.31 ^{a,μ}	603.06 ^a	441.12 ^a
Clase Textural	Franco	Franco	Franco

^μ Letras iguales en cada columna representan igualdad estadística (Tukey, $\alpha=0.05$); n=3

La clase textural de cada suelo se determinó con base en el triángulo de texturas de suelos que se muestra en el Anexo 2. Los porcentajes de cada tamaño de partícula de los suelos se presentan en la Figura 12.

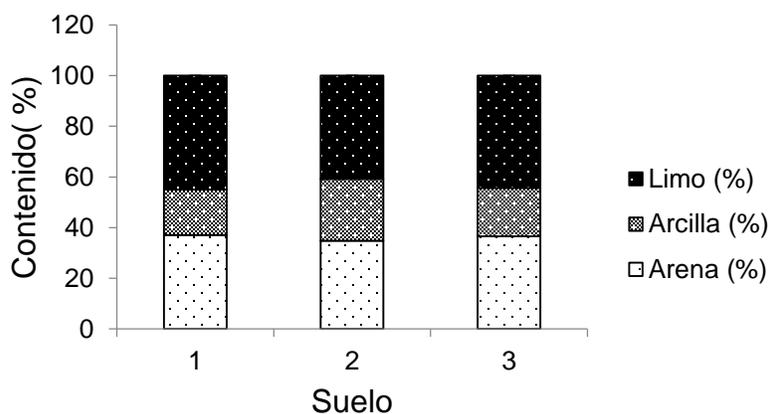


Figura 12. Porcentaje del tamaño de partícula presente en cada suelo.

7.2.2 Fenología

El número de días posteriores a la siembra en que iniciaron las etapas fenológicas denominadas emergencia (VE) y la aparición de las hojas (V1...Vn) del maíz fue estadísticamente igual en todos los tratamientos *i.e.* el tipo o concentración de NP no afectó significativamente la fase de crecimiento de las plántulas ni el crecimiento vegetativo (Figuras 2 y 13), ni la fase reproductiva (Figuras 2 y 14).

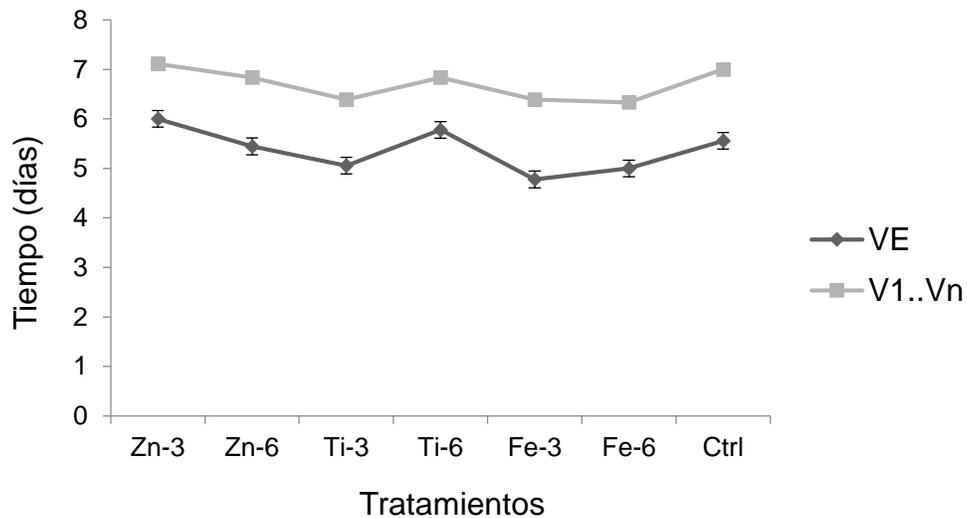


Figura 13. Inicio de las etapas fenológicas de emergencia (VE) y aparición de hojas (V1..Vn) en el cultivo de maíz tratado con diferentes concentraciones y tipos de NP. La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 5.

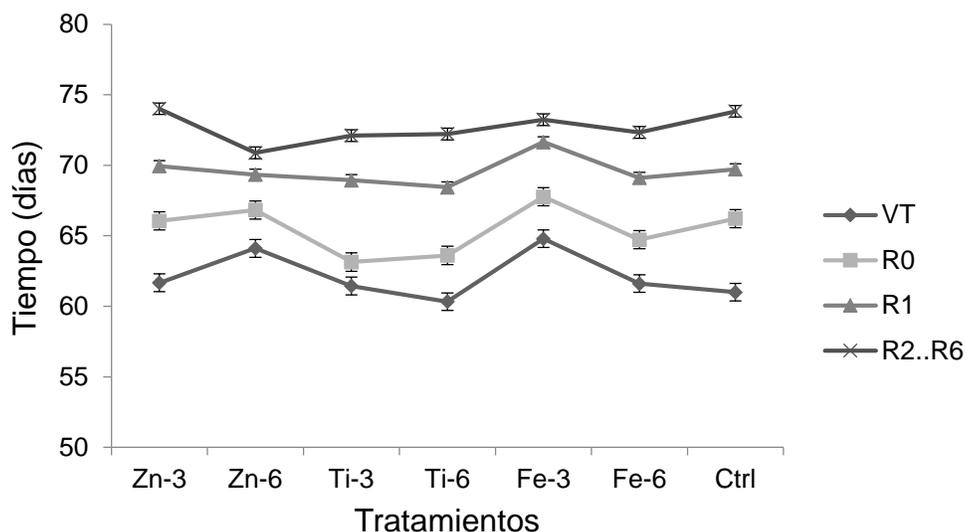


Figura 14. Inicio de las etapas fenológicas de aparición de la panoja (VT), floración (R0), aparición del estilo (R1) y llenado de grano (R2...R6). La descripción de los tratamientos se puede consultar en la Tabla 5.

7.2.3 Fisiología

Las unidades SPAD determinadas en las hojas de las plantas acondicionadas con NPs, a 3 y 6 gL⁻¹, no fueron afectadas significativamente por estas a los 30, 32, 51, 53, 55, 56, 58, 60, 62, 65, 70, 79, 93, 98, 100, 105, 107 y 111 DDS. Con base en el número de días que las unidades SPAD fueron significativamente diferentes al control, su efecto fue Fe3>Ti3>Ti6>Fe6=Zn6>Zn3 (Tabla 10).

Las unidades SPAD disminuyeron significativamente, comparadas con el tratamiento control, cuando las plantas fueron acondicionadas con:

- i) Fe-3 a 31 DDS, ii) Fe-3, Fe-6 y Zn-6 a 34 DDS, iii) Zn-3, Ti-3, Ti-6 y Fe-3 a 36 DDS, iv) Fe-3 y Fe-6 a 41 DDS, v) Fe-3 a 72 DDS, vi) Ti-3 a 84 DDS, vii) Fe-3 a los 86DDS y viii) Ti-6 a 91 DDS. Sin embargo, las

unidades SPAD aumentaron significativamente, comparadas con el tratamiento control, cuando las plantas fueron acondicionadas con: i) Fe-6 a los 39 DDS, ii) Zn-6, Ti-3 y Ti-6 a 48 DDS y iii) Ti-3 y Ti-6 a 77 DDS. A los 43 DDS las unidades SPAD incrementaron significativamente en plantas tratadas con Zn-6 y Ti-3, mientras que ese mismo día, el tratamiento Fe-3 disminuyó significativamente las unidades SPAD con respecto al control (Tabla 10).

Tabla 10. Unidades SPAD de plantas de maíz cultivadas en invernadero durante 112 días y acondicionadas con NPs de Zn, Ti y Fe a 200 y 400 mg kg⁻¹ de suelo seco.

DDS [€]	Concentración (g L ⁻¹)						Ctrl
	Zn		Ti		Fe		
	3	6	3	6	3	6	
30 [¥]	34.0 ^{a, μ}	33.3 ^a	33.5 ^a	33.3 ^a	33.1 ^a	35.6 ^a	34.0 ^a
31 [£]	38.3 ^b	41.0 ^{ab}	41.1 ^{ab}	43.2 ^a	34.6 ^c	40.6 ^{ab}	41.0 ^{ab}
32 [£]	46.9 ^a	44.9 ^{ab}	44.3 ^{ab}	43.8 ^b	43.0 ^b	44.9 ^{ab}	45.7 ^{ab}
34 [£]	45.4 ^{ab}	43.9 ^b	47.5 ^a	47.2 ^a	42.7 ^b	44.4 ^b	47.3 ^a
36 [£]	42.7 ^b	47.4 ^a	44.7 ^b	43.8 ^b	43.5 ^b	48.0 ^a	47.6 ^a
39 [£]	45.8 ^b	45.2 ^b	45.6 ^b	46.7 ^{ab}	45.5 ^b	47.8 ^a	45.4 ^b
41 [£]	47.7 ^a	46.0 ^{ab}	46.4 ^{ab}	46.3 ^{ab}	41.0 ^c	44.0 ^b	47.0 ^a
43 [£]	45.4 ^b	47.7 ^a	48.1 ^a	45.1 ^b	42.7 ^c	45.5 ^b	45.4 ^b
45 [£]	47.3 ^a	45.5 ^{ab}	45.9 ^{ab}	45.4 ^{ab}	44.0 ^b	46.9 ^a	46.3 ^{ab}
48 [£]	45.7 ^{ab}	47.0 ^a	48.0 ^a	47.0 ^a	44.8 ^b	46.0 ^{ab}	44.7 ^b
51 [£]	46.4 ^{ab}	48.8 ^a	47.9 ^{ab}	45.6 ^b	46.7 ^{ab}	45.4 ^b	47.6 ^{ab}
53 [£]	47.2 ^{bc}	46.5 ^{bc}	50.4 ^a	49.2 ^{ab}	45.0 ^c	48.8 ^{ab}	47.7 ^{abc}
55 [£]	45.7 ^{ab}	44.9 ^{ab}	47.1 ^a	46.6 ^{ab}	44.2 ^b	46.3 ^{ab}	46.0 ^{ab}
56 [£]	47.3 ^{ab}	45.8 ^b	46.8 ^{ab}	48.7 ^a	45.8 ^b	46.6 ^{ab}	47.5 ^{ab}
58 [£]	46.9 ^{ab}	46.2 ^b	47.6 ^{ab}	47.2 ^{ab}	47.3 ^a	49.3 ^{ab}	48.0 ^{ab}
60 [£]	45.3 ^{ab}	45.4 ^{ab}	45.5 ^{ab}	47.0 ^{ab}	44.3 ^b	47.3 ^a	45.7 ^{ab}
62 ^π	47.8 ^a	49.3 ^a	47.2 ^a	47.6 ^a	47.6 ^a	48.9 ^a	47.8 ^a
65 ^π	48.9 ^a	50.7 ^a	48.4 ^a	49.5 ^a	48.0 ^a	48.8 ^a	48.0 ^a
70 ^π	47.8 ^a	47.7 ^a	49.2 ^a	49.0 ^a	43.3 ^b	46.0 ^{ab}	46.2 ^{ab}
72 ^π	47.5 ^{ab}	47.6 ^{ab}	48.5 ^a	45.6 ^{abc}	43.2 ^c	44.5 ^{bc}	47.3 ^{ab}
77 ^π	47.0 ^{ab}	43.9 ^b	50.2 ^a	50.0 ^a	44.2 ^b	46.0 ^b	45.3 ^b
79 ^π	46.7 ^a	47.5 ^a	47.8 ^a	42.6 ^b	45.6 ^{ab}	47.5 ^a	45.4 ^{ab}
84 ^π	46.3 ^{ab}	48.1 ^a	44.1 ^b	46.3 ^{ab}	45.8 ^{ab}	45.5 ^{ab}	48.4 ^a
86 ^π	46.2 ^{ab}	46.0 ^{ab}	48.6 ^a	46.0 ^{ab}	43.5 ^b	46.7 ^a	47.5 ^a
91 ^π	44.9 ^{ab}	46.4 ^a	47.0 ^a	42.5 ^b	48.1 ^a	46.7 ^a	46.4 ^a
93 ^π	46.4 ^a	45.3 ^a	45.0 ^a	46.4 ^a	47.8 ^a	47.7 ^a	48.9 ^a
98 ^π	46.2 ^a	46.0 ^a	46.0 ^a	46.4 ^a	43.0 ^a	43.1 ^a	46.1 ^a
100 ^π	37.2 ^a	38.4 ^a	39.0 ^a	38.4 ^a	39.0 ^a	38.3 ^a	38.6 ^a
105 ^π	36.2 ^a	32.1 ^a	35.5 ^a	38.2 ^a	35.9 ^a	37.4 ^a	34.6 ^a
107 ^π	37.4 ^a	32.9 ^a	33.1 ^a	38.9 ^a	38.0 ^a	38.5 ^a	33.0 ^a
111 ^π	31.2 ^a	30.4 ^a	29.9 ^a	32.5 ^a	38.4 ^a	33.4 ^a	31.5 ^a

[€]Días después de la siembra. [¥]n=54 (3 sitios × 3 réplicas × 3 fechas de muestreo (30, 60 y 112 días) × 2 réplicas de todo el experimento). [£]n=36 (3 sitios × 3 réplicas × 2 fechas de muestreo (60 y 112 días) × 2 réplicas de todo el experimento). ^πn=18 (3 sitios × 3 réplicas × 1 fecha de muestreo (112 días) × 2 réplicas de todo el experimento). ^μValores con la misma letra dentro de la fila son significativamente iguales (Tukey, α= 0.05).

7.2.4 Características de la planta: biomasa y longitud

La longitud de planta, la biomasa aérea y el peso seco de raíz de plantas tratadas con NPs de ZnO, TiO₂ o Fe₂O₃ no presentaron diferencias significativas, comparadas con el tratamiento control. Sin embargo, las NPs de TiO₂ aumentaron significativamente la longitud de la raíz con respecto al control, mientras que las NPs de Fe₂O₃ incrementaron significativamente el peso fresco de raíz, comparadas con el tratamiento control (Tabla 11).

Tabla 11. Características de las plantas de maíz cultivadas en invernadero. Se presentan las medias de los tratamientos en sus tres cortes. Todo el experimento se repitió dos veces.

Características	Tipo de NP			Ctrl ^Ø
	Zn [£]	Ti [£]	Fe [£]	
Longitud de planta (cm)	128.45 ^{a, µ}	125.63 ^a	128.53 ^a	119.55 ^a
Biomasa aérea fresca (g)	110.69 ^a	106.16 ^a	106.97 ^a	100.19 ^a
Biomasa aérea seca (g)	28.14 ^a	31.00 ^a	27.09 ^a	27.65 ^a
Longitud de raíz (cm)	57.36 ^{ab}	60.85 ^a	57.44 ^{ab}	57.15 ^b
Peso de raíz fresca (g)	38.24 ^{ab}	33.01 ^b	39.21 ^a	32.41 ^b
Peso de raíz seca (g)	14.74 ^a	13.26 ^a	13.71 ^a	13.51 ^a

[£]n=108 (3 sitios × 3 réplicas × 2 concentraciones × 3 fechas de muestreo × 2 réplicas del experimento completo).

^Øn=54 (3 sitios × 3 réplicas × 3 fechas de muestreo × 2 réplicas del experimento completo).

^µValores con la misma letra dentro de la fila son significativamente iguales (Tukey, α= 0.05).

Tabla 12. Características de las plantas de maíz cultivadas en invernadero. Se presentan las medias de los tratamientos en sus tres cortes. Todo el experimento se repitió dos veces.

Características	Concentración (gL ⁻¹)		
	3 [£]	6 [£]	0 ^Ø
Longitud de planta (cm)	126.26 ^{a,µ}	128.77 ^a	119.55 ^a
Biomasa aérea fresca (g)	107.02 ^a	108.87 ^a	100.19 ^a
Biomasa aérea seca (g)	27.70 ^a	29.80 ^a	27.65 ^a
Longitud de raíz (cm)	58.20 ^a	58.91 ^a	57.15 ^a
Peso de raíz fresca (g)	37.03 ^a	36.57 ^a	32.41 ^a
Peso de raíz seca (g)	13.90 ^a	13.92 ^a	13.51 ^a

[£]n=162 (3 sitios × 3 réplicas × 1 concentraciones × 3 fechas de muestreo × 2 réplicas del experimento completo).

^Øn=54 (3 sitios × 3 réplicas × 3 fechas de muestreo × 2 réplicas del experimento completo).

^µValores con la misma letra dentro de la fila son significativamente iguales (Tukey, α= 0.05).

Las concentraciones de NPs empleadas en esta investigación no modificaron significativamente la longitud de planta, la biomasa aérea fresca, la biomasa aérea seca, la longitud de raíz, el peso fresco de raíz ni el peso seco de raíz, comparado con el tratamiento control (Tabla 12).

7.2.5 Componentes de rendimiento a la cosecha

Las NPs de Zn, Ti y Fe incrementaron significativamente el peso fresco de fruto, el peso seco de fruto y el peso seco de hojas con respecto al tratamiento control. El peso de mazorca aumentó significativamente en plantas tratadas con NPs de Ti y Fe, comparado con el control. Sin embargo, las plantas tratadas con NPs no incrementaron significativamente el peso seco de semilla, comparadas con el tratamiento control (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de NPs de ZnO, TiO₂ y Fe₂O₃ sobre las características del fruto de maíz cultivado en invernadero.

Características	Tipo de NP			
	Zn [£]	Ti [£]	Fe [£]	Ctrl ^Ø
Peso fresco de fruto (g) [±]	98.87 ^{b, µ}	111.30 ^a	108.42 ^{ab,}	85.06 ^c
Peso seco de fruto (g) [±]	58.35 ^b	59.71 ^b	66.24 ^a	47.98 ^c
Peso seco de hojas (g) ^Σ	38.87 ^b	37.16 ^b	47.72 ^a	32.02 ^c
Peso seco de mazorca (g)	9.31 ^{ab}	10.13 ^a	10.42 ^a	8.70 ^b
Peso seco de semillas (g)	8.80 ^a	8.99 ^a	9.27 ^a	8.62 ^a

[£]n=36 (3 sitios × 3 réplicas × 2 concentraciones × 1 fechas de muestreo × 2 réplicas del experimento completo).

^Øn=18 (3 sitios × 3 réplicas × 1 fechas de muestreo × 2 réplicas del experimento completo).

[±] Mazorca con hojas.

^Σ Hojas de la mazorca.

^µ Valores con la misma letra dentro de la fila son significativamente iguales (Tukey, α= 0.05).

El peso fresco del fruto, el peso seco del fruto, el peso seco de la hoja, el peso seco de la mazorca y el peso seco de la semilla incrementaron significativamente, comparado con el tratamiento control, cuando las plantas se acondicionaron con suspensiones de NPs a 6 gL⁻¹. Las suspensiones de NPs a concentraciones de 3 g L⁻¹ incrementaron significativamente el peso fresco del fruto, el peso seco del fruto y el peso seco de la hoja, comparado con el tratamiento control (Tabla 14).

Tabla 14. Efecto de la concentración de NP de ZnO, TiO₂ y Fe₂O₃ sobre las características del fruto de maíz cultivado en invernadero.

Características	Concentración (gL ⁻¹)		
	3 [£]	6 [£]	0 ^Ø
Peso fresco de fruto (g) ±	100.90 ^{b, µ}	111.38 ^a	85.06 ^c
Peso seco de fruto (g) ±	55.18 ^b	67.42 ^a	47.97 ^c
Peso seco de hojas (g) Σ	38.17 ^b	44.14 ^a	32.02 ^c
Peso seco de mazorca (g)	8.76 ^b	11.10 ^a	8.70 ^b
Peso seco de semilla (g)	8.04 ^b	9.96 ^a	8.61 ^b

[£]n=54 (3 sitios x 3 réplicas x 3 NP x 2 réplicas del experimento completo).

^Øn=18 (3 sitios x 3 réplicas x 2 réplicas del experimento completo).

± Mazorca con hojas.

Σ Hojas de la mazorca.

^µ Valores con la misma letra dentro de la fila son significativamente iguales (Tukey, α= 0.05).

VIII. DISCUSIONES

8.1 Ensayo de germinación

La germinación es el surgimiento y desarrollo de una plántula a partir del embrión de la semilla. Se considera que una semilla ha germinado cuando se han desarrollado sus estructuras esenciales (epicótilo, hipocótilo y cotiledón), mismas que determinan la capacidad de la semilla para producir una plántula normal en condiciones favorables [88]. Normalmente la germinación se expresa como el porcentaje de semillas que producen plántulas normales.

La FAO [89], determinó que durante el proceso de germinación la temperatura, humedad y luz son los principales factores que influyen en el porcentaje de germinación. Por otra parte, Murata *et al.* [90], determinaron que si bien los valores de pH y CE de la suspensión podrían afectar el porcentaje de germinación, dichas alteraciones no tiene efectos significativos. Al preparar la suspensión de NPs, el pH y la CE se modificaron (Tabla 6), sin embargo, los cambios detectados en dichos parámetros no afectaron el ensayo de germinación porque este se realizó en un periodo corto i.e. 7 días (Figura 11). Por otra parte al no encontrarse diferencias significativas en los ensayos de germinación se descarta un efecto del pH y CE.

En este experimento el tipo o concentración de NP no afectaron significativamente el porcentaje de germinación, lo cual concuerda con experimentos reportados por Zhongzhou *et al.* [91], quienes trabajaron con NPs de TiO₂, SiO₂, CeO₂, Fe₃O₄, Al₂O₃, ZnO y CuO a concentraciones de 100 mgL⁻¹ en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.). Por otro lado, Barrera *et al.* [92] reportaron que NPs

de Au, Ag y Fe₃O₄ a concentraciones de 62, 100 y 116 µg mL⁻¹, respectivamente, sí afectaron significativamente el porcentaje de germinación en semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.).

Prasad *et al.* reportaron que las plantas de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) tratadas con NPs de ZnO incrementaron significativamente el número de plántulas normales y la germinación, comparado con el tratamiento control [93] lo anterior coincide con los hallazgos de esta investigación, cuando las semillas de maíz tratadas con NPs de ZnO incrementaron significativamente el número de plántulas normales, comparado con las semillas tratadas con Fe₂O₃, a 3 g L⁻¹, sin embargo, ninguna NP incrementó significativamente el número de plántulas o peso total, comparado con el tratamiento control (Tabla 7). El Zn y el Fe forman parte de los 17 elementos considerados como nutrientes esenciales para los cultivos, mientras que el Ti no forma parte de este grupo de elementos y tampoco es considerado elemento benéfico para las plantas [94].

Los tratamientos Zn-3, Zn-6 y Fe-3 aumentaron significativamente el pesos fresco de los epicótilos, con respecto al control (Tabla 8), esto coincide con lo descrito por Servin *et al.* [95] quienes reportaron un aumento en la producción de biomasa de maíz (*Zea mays* L.) por efecto de NPs de zinc. Aunque en esta investigación no se encontraron efectos negativos, Lin *et al.* [96], demostraron la toxicidad de NPs de ZnO a concentraciones de 2000 mg L⁻¹ cuando la biomasa de plantas de maíz (*Zea mays* L.) disminuyó significativamente.

Las suspensiones de NPs preparadas a concentraciones de 3 gL⁻¹ de Ti o Fe disminuyeron significativamente el peso fresco de los cotiledones. Du *et al.* [97] reportaron efectos similares en plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cuando se aplicó TiO₂ en concentraciones de 270 mg de NPs kg⁻¹ suelo. El tratamiento de Ti-3 disminuyó significativamente el peso seco del hipocótilo, con respecto al control (Tabla 8), lo que coincide con Ruffini *et al.* [98] quienes observaron que NPs de Ti al 4 % inhibieron el crecimiento de la raíz de maíz (*Zea mays* L.).

Asli y Neumann [99] reportaron que las NPs de Ti reducen la disponibilidad de agua e inducen una respuesta fisiológica que disminuye al paso del agua a través del apoplasto *i.e.* las NPs de Ti inducen cambios fisiológicos en las células de las plántulas por estrés hídrico, pero dichos cambios fisiológicos no son inducidos por mecanismos relacionados con toxicidad de la NP.

Estudios recientes han demostrado que las NPs, aplicadas a diversas concentraciones, incrementan o disminuyen significativamente algunas características de las plántulas [100-105]. Otros autores sugieren profundizar los estudios relacionados con la interacción NP-planta porque poco se sabe sobre las respuestas fisiológicas de los cultivos ante la presencia de las NPs, mientras que los mecanismos de adsorción, absorción y translocación de NPs en plantas aún son desconocidos [106]. Es difícil ver un efecto de los tratamientos con NPs debido a que es bien conocido que en la etapa de germinación la plántula se nutre del endospermo, lo que quiere decir que no toma como nutrientes a las NPs; sin embargo no se observó estrés causado por la presencia de NPs en los procesos de germinación.

8.2 Ensayo en invernadero

Uno de los materiales necesarios para llevar a cabo el ensayo de invernadero fue el suelo, el cual se acondicionó y caracterizó (Tabla 9). El pH óptimo del suelo para que el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) se desarrolle se encuentra entre 5.5 y 7.5; sin embargo, puede cultivarse con éxito en suelos con pH de 5.5 a 8.5 ya que tanto las plantas de maíz y el suelo tienen la capacidad de amortiguar diferencias en el pH y tolerar la salinidad, siempre que esta no sea mayor que 7 dS m^{-1} [41]. Las plantas de maíz se desarrollan óptimamente en suelos franco-limosos, franco-arcillosos y franco-arcillo-limosos [41] y prospera en suelos de textura ligera a media [107]. Los resultados obtenidos durante la caracterización de suelo indican que este tiene las propiedades óptimas para que el cultivo de maíz se desarrolle adecuadamente.

Las distintas fases y etapas del ciclo de desarrollo se determinaron siguiendo la escala de Ritchie y Hanway [108]. En esta investigación, las nanopartículas empleadas a diferentes concentraciones no afectaron significativamente el inicio de las etapas fenológicas, comparadas con el tratamiento control. El INIFAP reportó que el ciclo de cultivo de variedades mejoradas de maíz llega hasta los 270 DDS [109]; sin embargo, el periodo depende de la variedad, condiciones climáticas y manejo; la variedad de maíz cultivada en este experimento alcanzó la madurez a los 112 DDS.

Existe una alta correlación entre el contenido de nutrientes en plantas de maíz y la concentración de clorofila en sus hojas. En consecuencia, el estado nutricional del cultivo de maíz puede ser evaluado a través de la medición del contenido de clorofila de la hoja [110]. El medidor de clorofila SPAD es un instrumento que permite evaluar indirectamente y en forma

no destructiva el contenido de clorofila en la hoja y por ende, el estado nutricional del cultivo [111].

Las NPs adicionadas a los suelos a diferentes concentraciones afectaron significativamente las unidades SPAD durante las primeras seis semanas de la etapa vegetativa *i.e.* antes de 50 DDS (Tabla 10), con valores de 34.6 a 48.1, lo que coincide con Piekielek *et al.* [112]. Ellos registraron valores de las unidades SPAD entre 29 y 57 durante la misma etapa vegetativa, cuando cultivaron maíz en condiciones de campo [112]. Los tratamientos empleados en esta investigación no afectaron significativamente las unidades SPAD durante los últimos días de la etapa vegetativa *i.e.* de 51 a 70 DDS. Los tratamientos de Ti y Fe sí presentaron diferencias significativas, comparadas con el control, entre 72 y 91 DDS, con valores que van de 42.5 a 50.2 unidades SPAD. Por su parte Zebarth *et al.* reportaron valores promedio de 43.7 unidades SPAD en plantas de maíz entre los 72 y 91 DDS, lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación [113].

En la última etapa fenológica *i.e.* en la etapa reproductiva, las unidades SPAD no presentaron diferencias significativas comparadas con el tratamiento control, debido a que a la mitad de la etapa reproductiva la planta inicia simultáneamente un proceso de senescencia, que implica la disminución de la actividad fotosintética y el desplazamiento de metabolitos hacia el fruto.

Las partes de la planta se analizaron estadísticamente para determinar si el tipo de NP o la concentración afecta significativamente la biomasa de las plantas (Tablas 11 y 12). Cuando se estudiaron los efectos del tipo de NP sobre las características de las plantas de maíz se observó que las NPs de Fe incrementaron significativamente el peso fresco de raíz en

comparación con el control (Tabla 11); mientras que las NPs de Ti aumentaron significativamente la longitud de la raíz, en comparación con el tratamiento control. Al respecto, no se encontraron estudios similares que reporten un efecto de este tipo de NP sobre el cultivo de maíz; no obstante, Prasada *et al.* reportaron que las NP de Zinc incrementaron significativamente la longitud de la raíz de plantas de maíz [114]. Como lo indicamos previamente, el Zn y el Fe son nutrientes esenciales para los cultivos, pero el Ti no forma parte de este grupo de elementos y tampoco es considerado elemento benéfico para las plantas. No obstante, diversos autores han reportado que el Titanio incrementa significativamente algunas características de la planta como, peso fresco, peso seco y contenido de clorofila en la planta [115]. Adicionalmente, la interacción de nutrientes en las plantas, puede ser positiva, negativa o neutra y es probable que uno de los factores más importantes que afectan el rendimiento sean las concentración de nutrientes en los cultivos y las características de la raíz *i.e.* longitud, peso seco y peso húmedo [116], el desarrollo radicular, en tanto, incide en la productividad de la planta.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el efecto de las nanopartículas en la biomasa y longitud de plantas de maíz está en función del tipo de NPs. Xingmao *et al.*, mencionan que para que las plantas respondan significativamente a la presencia de ciertas NPs es necesario aplicar altas concentraciones [117]; sin embargo, en esta investigación la concentración de las NPs empleadas no afectó significativamente ninguna de las variables estudiadas relacionadas con biomasa y longitud de plantas de maíz *i.e.* longitud de planta, biomasa aérea fresca, biomasa aérea seca, longitud de raíz, peso de la raíz fresca y peso de raíz seca (Tabla 12).

A los 112 DDS se determinaron los pesos de la biomasa aérea y raíz, así mismo se tomaron variables del fruto total en fresco y seco, así como los pesos secos de semilla, hoja y mazorca. En general, los tres tipos de NP incrementaron significativamente el peso fresco del fruto, el peso seco de fruto, el peso seco de hojas y peso seco de mazorcas, comparados con el tratamiento control (Tabla 13). Sin embargo, en esta investigación las NPs evaluadas no modificaron significativamente el peso seco de semillas, comparado con el tratamiento control (Tabla 13).

Wang *et al.* reportaron que las NPs de cerio a concentraciones de 10 gL^{-1} incrementaron significativamente el rendimiento del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) [118]. Otros autores han reportado que NPs de Ti a concentraciones de 0.02% aplicadas al cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) aumentaron significativamente el rendimiento de grano [119]. Lo anterior implica que las NPs empleadas en esta investigación tienen efecto sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo, pero no modifican significativamente el rendimiento de semillas.

Existen diferentes rutas por las cuales las plantas pueden absorber las NPs, sin embargo, aún no se han determinado detalles morfológicos y fisiológicos sobre los mecanismos de absorción, los sitios de acumulación, ni la interacción de NPs sobre la producción de metabolitos en plantas [14, 71, 120], por lo que si bien, las NPs afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, estas no afectan el proceso de formación y llenado de grano. Con frecuencia la acumulación de NPs se produce fundamentalmente en la parte aérea de la planta, lo que favorece su crecimiento y producción de biomasa en parte aérea [121].

Es probable que en este experimento las plantas de maíz respondan a través de mecanismos similares a los que se activan cuando algunos

cultivos *i.e.* girasol (*Helianthus annuus* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), maíz (*Zea mays* L.), entre otros, son expuestos a metales pesados. Las plantas capaces de acumular metales en su parte aérea o raíz, sin presentar severas alteraciones morfológicas o fisiológicas, son consideradas tolerantes a la presencia de metales y responden incrementando su tasa de crecimiento y elevando su producción de biomasa, pero no su rendimiento [122].

Las características del fruto en este experimento fueron estadísticamente diferentes, comparadas con el tratamiento control, cuando las plantas se acondicionaron con diferentes concentraciones de NPs (Tabla 14). Behera *et al.* reportaron un aumento en los rendimientos a la cosecha de maíz (*Zea mays* L.) por efecto de NP de Zn y Fe [123], otros autores han reportado que las NPs de Ag incrementan el rendimiento de maíz forrajero (*Zea mays* L.) [124]. Cuando los cultivos disponen de un buen sistema de raíces y están en condiciones óptimas de humedad y nutrición, las plantas enviarán señales de tipo hormonal que potenciarán el desarrollo de brotes y frutos. En este sentido, las plantas tratadas con dosis altas de NP *i.e.* 6 gL^{-1} , fueron las que incrementaron significativamente el peso seco de semilla (Tabla 14).

IX. CONCLUSIONES

- 1) Las NPs de ZnO, TiO₂, Fe₂O₃ no afectaron significativamente el porcentaje de germinación ni el peso seco o fresco de la plántula, sin embargo, modificaron significativamente los pesos fresco o seco del epicótilo, hipocótilo o cotiledon.
- 2) Las NPs de ZnO, TiO₂, Fe₂O₃ a concentraciones de 3 y 6 gL⁻¹ afectaron significativamente las unidades SPAD durante la etapa vegetativa, pero estas no tuvieron efecto sobre las unidades SPAD una vez que las plantas iniciaron su etapa reproductiva. Adicionalmente, las NPs empleadas no afectaron significativamente la aparición de las etapas fenológicas ni la longitud de la planta, la biomasa aérea fresca o seca, el peso de raíz seca, ni el peso de semilla seca pero, las NPs incrementaron significativamente el peso seco y fresco del fruto, el peso seco de hojas y el peso seco de las mazorcas.
- 3) La concentración de NPs no afectó significativamente la biomasa y longitud de plantas, pero sí modificó significativamente los componentes de rendimiento a la cosecha.
- 4) El tipo de NP o su concentración afectaron significativamente al menos una variable relacionada con la germinación de semillas, la actividad fotosintética, la biomasa, la longitud de planta y los componentes de rendimiento.

X. PERSPECTIVAS

Se deben definir protocolos para ensayos de toxicidad de NPs en plantas que consideren las particularidades de cada nanomaterial. También es necesario realizar evaluaciones en cámara de crecimiento, invernadero y campo en las que se determine la tolerancia máxima de cada cultivo a cierta NP, ya que las plantas al ser organismos vivos responden diferencialmente a factores bióticos y abióticos, a través de respuestas bioquímicas activadas bajo ciertas condiciones de estrés. Por lo anterior, se deben realizar investigaciones adicionales relacionadas con:

- 1) La elucidación de los mecanismos de adsorción, absorción y translocación de NP en plantas.
- 2) El análisis de los procesos de interacción NP-planta.
- 3) El estudio de la actividad enzimática de las plantas tratadas con NP.
- 4) La caracterización de las alteraciones fisicoquímicas de las NP al entrar en contacto con plantas y microorganismos del suelo.

XI. BIBLIOGRAFIA

- [1] A.M. Al-Halafi. Nanocarriers of nanotechnology in retinal diseases. Saudi J. Ophthalmol. 28 (2014) 304–309.
- [2] C. Thomas, S. George, A. Horst, Z. Ji, R.J. Miller, J. Peralta-Videa, T. Xia, S. Pokhrel, L. Madler, J.L. Gardea-Torresdey, P. Holden, A. Keller, H. Lenihan, A. Nel y J.I Zink. Nanomaterials in the environment: from materials to high-throughput screening to organisms. ACS Nano. 5 (2011) 13–20.
- [3] R. Paliwal. El maíz en los trópicos. Departamento de Agricultura. FAO.Descargado: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s02.htm>. Consulta: Agosto 2014
- [4] J.J. Sánchez, M. M. Goodman, C. W. Stuber. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. Econ. Bot. 54 (2000) 43-59.
- [5] V.A Vidal, M. Vázquez, G.C. Coutiño, B.E. Ortega, A.C.Ramírez, J.L.D. Valdivia, R.B. Guerrero, M.J Caro, O.F Cota. Calidad proteínica en colectas de maíces criollos de la sierra de Nayarit, México. Rev. Fitotec. Mex. 31 (2008) 15-21.
- [6] SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Situación Actual y Perspectivas del Maíz en México 1996 – 2012. SAGARPA. 208 (2008).
- [7] S.O Serna, C.A Amaya, M. Rodríguez, S.O. Serna, F. Sánchez. Nixtamalización del Maíz a la Tortilla. Aspectos Nutrimientales y Toxicológicos. Universidad Autónoma de Querétaro: Series Ingeniería. (2008) 105-151.

- [8] R. Fernández, L.A Morales, A. Gálvez. Importance of Mexican Maize landraces in the National diet: an essential review. *Rev. Fitotec. Mex.* 36 (2013) 275-283.
- [9] F.A Turrent y D.R Moreno. Producción sostenible de alimentos de origen vegetal en el mundo. *Terra Latinoamericana.* 16 (1998) 93-111.
- [10] F.A Turrent. Estrategias científicas y tecnológicas para reforzar la productividad agrícola de México ante el cambio climático. *Academia mexicana de ciencias.* 1 (2012) 427-437.
- [11] A. Wise. The Cost to Mexico of U.S. Corn Ethanol Expansion. Medford, Mass. Global Development and Environment. Global Development and Environment Institute Tufts University. 12 (2012) 1-14.
- [12] C.A Espinosa, R.M Tadeo, F.A Turrent, M.N Gómez, M.O Sierra, H. Caballero, B.F.R Valdivia, M.F. Rodríguez. El potencial de las variedades nativas y mejoradas de maíz. *Ciencias.* 93 (2009) 118-125.
- [13] F. Márquez. Predicción de sintéticos de maíz hechos con cruces simples. *Agrociencia.* 41 (2007) 647-651.
- [14] C. Vega. Entrevista personal, Instituto Mexicano Del Maíz "Dr. Mario E. Castro Gil" (IMM). Coahuila, México (2015).
- [15] J. Ruiz, G. Medina, I. Gonzalez, H. Flores, G. Ramírez, C. Ortiz, K. Byerly, R. Martinez. Requerimientos agroecológicos de cultivos. *INIFAP.* 3 (2013).
- [16] J. W. Krumpfer, T. Schuster, M. Klapper, K. Müllen. Make it nano-Keep it nano. *Nano Today.* 8 (2013) 417-438.
- [17] S. Irvani. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 13 (2011) 2638.

- [18] D. G. Rickerby y M. Morrison. Nanotechnology and the environment: A European perspective. *Environ. Sci. Technol.* 8 (2007) 19-24.
- [19] S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, and R. Y. Surampalli. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. *Waste Manag.* 30 (2010) 504–520.
- [20] H. Joseph, M. Craig, S. Saion, W. Jason. Accumulation and phytotoxicity of engineered nanoparticles to *Cucurbita Pepo*. *Int. J. Phytoremediat.* 14 (2012) 429-442.
- [21] E. Nielsen. Nanotechnology Opportunity Report. EBN Consulting 3 (2008).
- [22] Comunicado de prensa de Lux Research. “Economy Blunts Nanotech’s Growth”. (2009).
- [23] T. Tong, K Fang, S. Thomas, J. Kelly, K. Gray, J. Gaillard. Chemical Interactions between nano-ZnO and nano-TiO₂ in a natural aqueous medium. *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7924–7932.
- [24] Peralta-Videa, L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. De la Rosa, J. Hong. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. *J. Hazard Mater.* 186 (2012) 1-15.
- [25] S.J. Klaine, P.J.J. Alvarez, G. E. Batley, T. F Fernandes, R. D. Handy, D. Y Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1825.

- [26] Josko y P. Oleszczuk. Influence of soil type and environmental conditions on ZnO, TiO₂ and Ni nanoparticles phytotoxicity. *Chemosphere*. 92 (2013) 91-99.
- [27] A.Keller, S. McFerran, A. Lazareva, S. Suh. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1692-1694.
- [28] G.P. Gruère. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries. *Food Policy*. 37 (2012) 191–198.
- [29] V. Guerrero y P. Calvopina. Síntesis catalítica de nanopartículas de hematita y su aplicación en la remoción de cromo. *Revista Politécnica*. 32 (2012) 65-69.
- [30] W.T. Self, A. Karakoti, S. Singh J.M. Dowding, S. Seal. Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4422-4432.
- [31] C.Y. Dong, T.R Kuo, C.L. Wu, C.T. Hsu, W. Lo, S. J. Chiang, S.J Lin, Ch.Y. Dong, Ch. Chen. Chemical enhancer induced changes in the mechanisms of transdermal delivery of zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 30 (2009) 3002-3008.
- [32] H. Nabeshi, T. Yoshikawa, A. Arimori, T. Yoshida, S. Tochigi, T. Hirai, T. Akase, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, S. I. Tsunoda, N. Itoh, Y. Yoshioka, I. Tsutsumi. Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 93.
- [33] B. Martinello, L. Rodrigues, A. Bermardin. Síntesis de nanopartículas de ZnO por el proceso sol-gel. *Ceramic and Glass*

Materials Group. Santa Catarina Extreme South University, Criciuma, SC. (2007) 21-30.

[34] A. Zalts. Metales, ambiente y las sociedades tecnológicas: ¿hacia dónde nos dirigimos?. *Química Viva*. 10 (2011) 1-20.

[35] M. Vargas, Y. Ochoa, Y. Ortegon, P. Mosquera, J. Rodriguez, J. Camargo. Nanoparticulas de TiO₂, fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos. *Ingeniería y desarrollo*. 29 (2011) 186-201.

[36] K. Dietz y S. Herth. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci*. 11 (2011) 582-589.

[37] J. Mazo-Zuluaga, C. Barrero, J. Diaz-Teran, A, Jerez, J, Restrepo, A. Morales. Transformación magnetita-hematita inducida térmicamente. *Revista Colombiana de Física*. 33 (2014) 230-233.

[38] Y. Cohen, R. Rallo, R. Liu, H. H. Liu. In Silico Analysis of Nanomaterialshazard and Risk Accounts. *Chem. Res*. 46 (2013) 802-812.

[39] A.O. Al-Khashman. Assessment of heavy metals contamination in deposited street dusts in different urbanized areas in the city of Ma'an Jordan. *Environ. Earth. Sci*. 70 (2013) 2603-2612.

[40] M.W. Chai, F.C. Shi, R.L. Li, L.M. Liu, Y. Liu, F.C. Liu. Interactive effects of cadmium and carbon nanotubes on the growth and metal accumulation in a halophyte *Spartina alterniflora* (*Poaceae*). *Plant Growth Regul*. 71 (2013) 171-179.

[41] D. A. Navarro, M.A. Bisson, D.S. Aga. Investigating uptake of water-dispersible CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles by *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Hazard. Mater*. 212 (2012) 427– 435.

- [42] T. Nel, H. Xia, X. Meng, S. Wang, Z. Lin, H. Ji, Y Zhang. Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 607-621.
- [43] G. V Lowry, K. B. Gregory, S. C. Apte, and J. R. Lead. Transformations of nanomaterials in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6893–6899.
- [44] M. Frejo, M. Dias, M. Lobo, J. Garcia, M. Capó, Nanotoxicologia ambiental: retos actuales. *Medicina Balear.* 26 (2012) 36-46.
- [45] L. Zhao, J. A. Hernandez-Viezcas, J.R. Peralta-Videa, S. Bandyopadhyay, B. Peng, B. Munoz, A.A. Kellercce, J.L. Gardea-Torresdey. ZnO nanoparticle fate in soil and zinc bioaccumulation in corn plants (*Zea mays*) influenced by alginate. *Environ. Sci. Proc. Imp.* 15 (2013) 260-266.
- [46] K. Dietzl, S. Herth. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci.* 16 (2011) 582-589.
- [47] V. Stone, H. Johnston, and M. J. D. Clift. Air Pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: Cellular and molecular interactions. *IEEE Trans. Nanobioscience.* 6 (2007) 331–340.
- [48] Y. Ju-Nam, J. R. Lead. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* 200 (2008) 396-414.
- [49] C.M. Rico, J. Hong, M.I. Morales, L.J. Zhao, A.C Barrios, J.Y. Zhang, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: A study involving the antioxidant defense system

and in vivo fluorescence imaging. *Environ. Sci. Technol.* 47 (2012) 5635-5642.

[50] L. Schreiber. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends Plant Sci.* 15 (2011) 546-553.

[51] J. Geisler-Lee, Q. Wang, Y. Yao, W. Zhang, M. Geisler, K. Li, Y. Huang, Y. Chen, A. Kolmakov, X. Ma. Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology.* 7 (2013) 323-337.

[52] Z. Wang, X. Xie, J. Zhao, X. Liu, W. Feng, J.C White, B. Xing. Xylem- and Ploem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 4434–4441.

[53] R. Baker, P. Martin, S. Davis. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquat. Toxicol.* 40 (1997) 51–61.

[54] X. Zhu, J. Wang, X. Zhang, Y. Chang, Y. Chen. The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology.* 20 (2009) 95-103.

[55] Y. Mahdi, S. Fatemeh, A. Hoseininia, A. Gharaati, V. Azizifar. The Effect of nanoparticle ZnO on environment and different organisms (Review). *Int. J. Plant Sci.* 2 (2012) 95-102.

[56] J. Urrutia. La seguridad y salud en la exposición a nanopartículas: por un desarrollo seguro de las nanotecnologías. Instituto Riojano de salud laboral. 101 (2011).

- [57] D. Gutierrez-Praena, A. Jos, S. Pichardo, M. Puerto, E. Sanchez-Granados, A. Grilo. Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Revista de Toxicología*. 26 (2009) 87-92.
- [58] G. Foladori, N. Invernizzi. Nanotecnologia: beneficios para todos o mayor desigualdad. *Revista redes*. 11 (2005) 55-75.
- [59] M. Niederberger. Nonaqueous sol-gel routes to metal oxide nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 793–800.
- [60] M.E. Franke, T. J. Koplín, U. Simon. Metal and metal oxide nanoparticles in chemiresistors: Does the nanoscale matter?. *Small*. 2 (2006) 36–50.
- [61] A. Kolmakov, M. Moskovits. Chemical sensing and catalysis by one-dimensional metal-oxide nanostructures. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 34 (2004) 151–180.
- [62] P. K. Stoimenov, R. L. Klinger, G. L. Marchin, K. J. Klabunde. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*. 18 (2002) 6679–6686.
- [63] J.H. Priester, Y. Ge, R.E. Mielke, A.M Horst, S.C. Moritz, K. Espinosa, J. Gleb, S.L. Walker, R.M. Nisbet, Y.K. An, J.P. Schimel, R.G. Palmer, J.A. Hernandez-Viezcas, L.J. Zhao, J.L. Gardea-Torresdey, P.A. Holden. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*. 109 (2012) 2451-2456.
- [64] H. Zhu, J. Han, J. Q. Xiao, Y. Jin. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 713-717.

- [65] M. Maurer-Jones, I. L. Gunsolus, C. Murphy, C. Baynes. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal. Chem.* 85 (2013) 3036-3049.
- [66] S. Arruda, A. Diniz, R. Moretto, R. Antunes, M. Zezzi. Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta.* 131 (2015) 693-705.
- [67] S. Asli, P. Neumann. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide NPs can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell Environ.* 32 (2009) 577–584.
- [68] P. Begum, R. Ikhtari, B. Fugetsu. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red, spinach and lettuce. *Carbon.* 49 (2011) 3907-3919.
- [69] C. Larue, M. Pinault, B. Czarny, D. Georgin, D. Jaillard, N. Bendiab, M. Mayne-L, F. Taran, V. Dive, M. Carriere. Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed. *J. Hazard. Mater.* 1 (2012) 155-163.
- [70] U. Song, H. Jun, B. Waldman, J. Roh, Y. Kim, J. Yi, E. Lee. Functional analyses of nanoparticles toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93 (2013) 60-67.
- [71] T. Shaymurat, J. Gu, C. Xu, Z. Yang, Q. Zhao, Y. Liu. Phytotoxic and genotoxic effects of ZnO nanoparticles on garlic (*Allium sativum* L.): a morphological study. *Nanotoxicology.* 6 (2012) 241-248.
- [72] M. Kumari, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 5243-5246.

- [73] M. Seifshandi, A. Sorooshzadeh. Comparison between the influences of silver nanoparticles and silver nitrate on the growth and phytochemical properties of borage (*Borago officinalis* L.) Curr. Nanosci. 9 (2013) 241-247.
- [74] M. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hernandez, J. Gardea-Torresdey. X Ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 3689-3696.
- [75] M. C. Roco. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. J. Nanoparticle Res. 13 (2011) 427–445.
- [76] E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi, and L. Sigg. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology. 17 (2008) 372–86.
- [77] F. Gottschalk, T. Sonderer, and R. W. Scholz. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 9216–9222.
- [78] International Seed Testing Association (ISTA). International Rules for Seed Testing. Seed Sci. and Tech. 13 (1985) 299-335.
- [79] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa). Manual para el análisis de calidad de semillas para la siembra. SAGARPA. (2014).

- [80] R. Araya, K. Martínez, A. López, A. Murillo. Protocolo para el manejo postcosecha de la semilla frijol. FAO. 1 (2013).
- [81] Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Descargado de: <http://gaia.inegi.org.mx/mdm6>. Consultado: 25/08/2014.
- [82] F. Fernández-Luqueño, V. Reyes-Varela, C. Martínez-Suárez, G. Salomón-Hernández, J. Yáñez-Meneses, J.M. Ceballos-Ramírez, L. Dendooven. Effect of different nitrogen sources on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioresource Technol.* 101 (2010) 396–403.
- [83] Regional Salinity Laboratory (U. S). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Dept. of Agriculture. 1 (1954).
- [84] United States Department of Agriculture. Methods for Soil Characterization, de Determination of the properties of saline and alkali soils. Government Printing Office. (1954) 122-124.
- [85] G. W. Thomas, D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert. Methods of Soil Analysis Part 3 - Chemical Methods, Soil Science. Society of America Inc and American Society of Agronomy Inc. (1996) 475-490.
- [86] J. D. Rhoades, D.L. Sparks. Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids. American Society of Agronomy Inc. (1996) 417–435.
- [87] J. Markwell, J.C Osterman, J.L Mitchell. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynth. Res.* 46 (1995) 467–472.

- [88] R. Willan. A guide to forest seed handling. FAO (2014). Consultado en: <http://www.fao.org/docrep/006/AD232S/ad232s12.htm> en Octubre del 2014.
- [89] FAO. Guía para la manipulación de semillas forestales. Consultado en: <http://www.fao.org/docrep/006/ad232s/ad232s12.htm> en Febrero del 2015
- [90] M. Murata, P. Hammes, G. Zharare. Effect of solution pH and calcium concentration on germination and early growth of groundnut. *J. Plant Nutr.* 26 (2003) 1247–1262.
- [91] Y. Zhongzhou, C. Jing, D. Runzhi, G. Xiang, M. Chuanbin, L. Wang. Assessment of the Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles on Two Crop Plants, Maize (*Zea mays* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Environ. Res.* 12 (2015) 15100-15109.
- [92] R. Barrena, E. Casals, J. Colón, X. Font, A. Sánchez, V. Puentes. Evaluation of ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere.* 75 (2009) 850–857.
- [93] T. Prasad, P. Sudhakar, Y. Sreenivasulu, P. Latha, V. Munaswamy, K. Raja Reddy, T. S. Sreeprasad, P. R. Sajanlal , T. Pradeep. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J. Plant Nutr.* 35 (2012) 905-927.
- [94] A. Kabata-Pendias. Trace elements in soils and plants, 4^a. ed., Taylor & Francis Group, Florida, 2010.
- [95] X A. Servin, E. Wade, A. Mukherjee, R. De la Torre-Roche, H. Hamdi, J. C. White, P. Bindraban, C. Dimkpa. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *J. Nanopart. Res.* 17 (2015) 92.

- [96] D. Lin, B. Xing. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* 150 (2007) 243–250.
- [97] W. Du, Y. Sun, R. Ji, J. Zhu, J. Wu, H. Guo. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 822-828.
- [98] C. Ruffini, L. Giorgetti, C. Geri, R. Cremonini. The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *J. Nanopart. Res.* 13 (2010) 2443–2449.
- [99] A. Anjum, S. S. Gill, A. Duarte, E. Pereira, I. Ahmad. Silver nanoparticles in soil–plant systems. *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1896-1807.
- [100] A. Lee, S. Mahendra, K. Zodrow, D. Li, Y. Tsai, J. Braam, P. Alvarez. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Toxicol.* 29 (2010) 669–675.
- [101] Y. Ma, L. Kuang, X. He, W. Bai, Y. Ding, Z. Zhang, Y. Zhao, Z. Chai. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere.* 78 (2010) 273–279.
- [102] T. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. Grass, L. Limbach, A. Bruinink, W. Stark. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4374–4381.
- [103] M. Khodakovskaya, E. Dervishi, M. Mahmood, Y. Xu, Z. Li, F. Watanabe, A.S. Biris. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano.* 10 (2009) 3221–3227.

- [104] F. Hong, J. Zhou, C. Liu, F. Yang, C. Wu, L. Zheng, P. Yang. Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biol. Trace. Elem. Res.* 105 (2005) 269-279.
- [105] F. Yang, F. Hong, W. You, C. Liu, F. Gao, C. Wu, P. Yang. Influences of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biol. Trace. Elem. Res.* 110 (2006) 179-190.
- [106] X. Ma, J. Geiser-Lee, Y. Deng, A. Kolmakov. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci. Total. Environ.* 408 (2010) 3053-3061.
- [107] Food and Agriculture Organization. El estado mundial de la agricultura y la alimentación, FAO, Roma, 1994.
- [108] S. W. Ritchie, J.J. Hanway. How a corn plant develops. *Spec. Rep. Coop.* 48 (1982).
- [109] Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Manejo integrado del cultivo del maíz suave. INIAP. (2011).
- [110] D. Wolfe, D. W. Henderson, T. C. Hsiao, A. Alvino. Interactive water and nitrogen effects on senescences of maize. II. Photosynthetic decline and longevity of individual leaves. *Agron. J.* 80 (1988) 865-870.
- [111] H. Sainz, H. E. Echeverría. Relación entre las lecturas del medidor de clorofila (Minolta SPAD 502) en distintos estadios del ciclo del cultivo de maíz y el rendimiento en grano. *Revista de la Facultad de Agronomía.* 103 (1998) 37-44.
- [112] W. Piekielek, R. H. Fox. Use of a chlorophyll meter to predict nitrogen requirements for maize. *Agron. J.* 84 (1992) 59-65.

- [113] B. Zebarth, M. Younie, J. W. Paul, S. Bittman. Evaluation of leaf chlorophyll index for making fertilizer nitrogen recommendations for silage corn in a high fertility environment. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33 (2002) 665–684.
- [114] T. N. V. K. V. Prasad, P. Sudhakar, Y. Sreenivasulu, P. Latha, V. Munaswamy, K. Raja Reddy, T. S. Sreeprasad, P. R. Sajanlal, T. Pradeep. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J. of Plant Nutr.* 35 (2012) 905-927.
- [115] M. Linglan, L. Chao, Q. Chunxiang, Y. Sitao, L. Jie, G. Fengqing, H. Fashui. Rubisco activase mRNA expression in spinach: modulation by nanoanatase treatment. *Biol. Trace Elem. Res.* 122 (2008) 168-178.
- [116] N. Fageria, V.C. Baligar, R.B. Clark. Micronutrients in crop production. *Adv. Agron.* 77 (2002) 185–250.
- [117] M. Xingmao, J. Geiser-Lee, Y. Deng, A. Kolmakov. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 7-15.
- [118] Q. Wang, X Ma, W. Zhang, H Pei, Y Chen. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. *Metallomics.* 4 (2012) 1105-1112.
- [119] A. Jaberzadeh, P. Moaveni, H. R. Tohidi, H. Zahedi. Influence of bulk and nanoparticles titanium foliar application on some agronomic traits, seed gluten and starch contents of wheat subjected to water deficit stress. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* 41 (2013) 201-207.
- [120] J. D. Judy, J. Unrine, W. Rao, S. Wirick, P. Bertsch. Bioavailability of gold nanomaterials to plants: importance of particle size and surface coating. *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 8467-8474.

- [121] R. R. Brooks Plants that hyperaccumulate heavy metals. *Ann. Bot.* 82 (1998) 267-271.
- [122] A. Benavides. Temas modernos de nutrición vegetal. Sociedad mexicana de la ciencia del suelo. (2009).
- [123] S. K. Beheraa, A. K. Shuklab, M. V. Singhb, R. H. Wanjarib, P. Singhb. Yield and Zinc, Copper, Manganese and Iron Concentration in Maize (*Zea mays* L.) Grown on Vertisol as Influenced by Zinc Application from Various Zinc Fertilizers. *J. Plant Nutr.* 38 (2015) 1544-1557.
- [124] A. Berahmand, A. Panahi, H. Sahabi, H. Feizi, P. R. Moghaddam, N. Shahtahmassebi, A. Fotovat, H. Karimpour, O. Gallehgir. Effects Silver Nanoparticles and Magnetic Field on Growth of Fodder Maize (*Zea mays* L.). *Biol. Trace Elem. Res.* 149 (2012) 419-424.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de la suspensión de nanopartícula.

Para la preparación de las suspensiones de NPs se utilizó un matríz Erlenmeyer de 500 mL, agua destilada, NPs de ZnO, TiO₂ y Fe₂O₃, y una balanza de precisión Ohaus Modelo PA512 Pioneer. Posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para la preparación de las suspensiones de NPs, se pesó la cantidad de NPs dependiendo de la concentración y se mezcló uniformemente con agua destilada.

Anexo 2. Análisis de características texturales.

Se llevó a cabo el análisis de características texturales utilizando un hidrómetro estándar para suelos ASTM No. 1. 152 H con escala Bouyoucos en g L^{-1} , agitador magnético, un émbolo y un cilindro de sedimentación con marca de 1000 mL a 36 ± 2 cm desde el fondo al interior, termómetro, vaso de precipitado, pentanol, balanza de precisión Ohaus Modelo PA512 Pioneer, placa de agitación magnética Cimarec™ Thermo Scientific Modelo SP131325. Se llevó a cabo la calibración del hidrómetro agregando 100 mL de solución de $[(\text{NaPO}_3)_6]$ (50 g L^{-1}) al cilindro de sedimentación hasta completar 1000 mL con agua destilada; luego se mezcló vigorosamente con el émbolo, se introdujo el hidrómetro en el recipiente y se determinó la escala leyendo RL en el borde superior. La determinación de la proporción relativa de los agregados del suelo se realizó colocando en el cilindro de sedimentación 40 g de suelo y 100 mL de la solución de $[(\text{NaPO}_3)_6]$ (50 g L^{-1}), y 300 mL de agua destilada, se dejó la muestra en reposo por 12 h, después se colocó el vaso con la muestra tratada con $[(\text{NaPO}_3)_6]$ sobre la placa de agitación magnética, y se mezcló por 5 minutos, posteriormente se transfirió la suspensión al cilindro de sedimentación y se aforó a 1000 mL. Se dejó reposar a temperatura constante. Se insertó el émbolo moviendo hacia arriba y abajo para mezclar el contenido, se procedió a introducir el hidrómetro y tomar lecturas después de 40 s (R_{40s}), se retiró cuidadosamente el hidrómetro, se enjuagó y seco. A las 7 horas se tomó la última lectura (R_{7h}).

Para la determinación del peso seco, se pesó una muestra de suelo de 10 g y se dejó secar por 16h a 100°C . Los cálculos se realizaron de la siguiente manera.

- Arena

$$\% \text{ Arena} = 100 - (R_{40s} - R_L) \times \frac{100}{\text{suelo secado en horno (g)}}$$

- Arcilla

$$\% \text{ Arcilla} = (R_{7h} - R_L) \times \frac{100}{\text{suelo secado en horno (g)}}$$

- Limo

$$\% \text{ Limo} = 100 - (\% \text{ Arena} + \% \text{ Arcilla})$$

En la siguiente figura se representa el diagrama triangular de las clases texturales básicas del suelo según el tamaño de las partículas, de acuerdo con el USDA

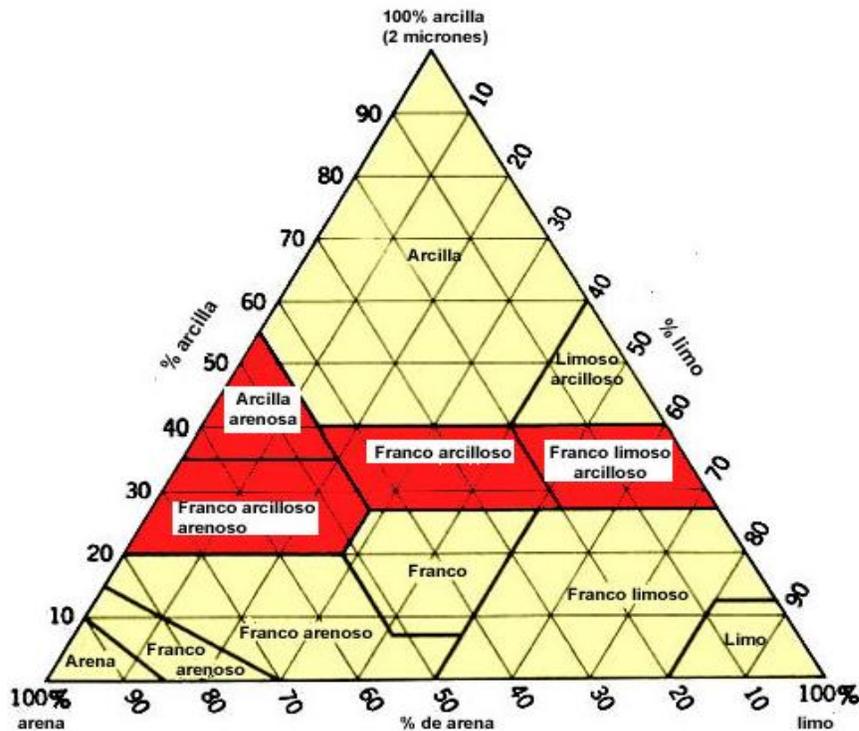


Diagrama triangular de las clases texturales del suelo con base en el tamaño de las partículas.

Anexo 3. Metodología del análisis del potencial de hidrogeno (pH) al suelo

Para la determinación de pH se utilizaron 9 frascos ámbar de 30 mL, micropipeta automática de 0.5–5 mL, estándares de pH, agua desionizada, piseta con agua destilada, medidor Thermo Scientific Orion Star A212, electrodo de vidrio Orion 8302BNUMD ROSS® Ultra pH/ATC Triode®. La suspensión de suelo fue en una relación 1:1, se pesaron 10 g de suelo tamizado en una malla de 0.2 cm, se vació en un frasco ámbar de 30 mL, esto se realizó por triplicado para cada muestra de suelo (S1, S2 y S3). Posteriormente se agregaron 10 mL de agua desionizada y se agitó vigorosamente, posteriormente se insertó el electrodo dentro de la suspensión y se tomó la lectura.

Anexo 4. Análisis de la conductividad eléctrica del suelo

Se realizó el análisis de CE en la que fueron necesarias 9 botellas de dilución de 100 mL, 9 frascos ámbar de 30 mL, micropipeta automática de 0.5 – 5 mL, estándares de conductividad, agua desionizada, piseta con agua destilada, matraz de aforación de 100 mL, 9 Embudos, papel filtro, balanza de precisión Ohaus Modelo PA512 Pioneer, medidor Thermo Scientific Orion Star A212, electrodo Orion 013005MD Conductivity Cell y un agitador orbital Thermo Scientific Modelo 4625. Fue necesaria una solución de hexametáfosfato de sodio $(\text{NaPO}_3)_6$ al 1 %. Se preparó la suspensión de suelo-agua en una relación 1:2 y se pesaron 10 g de suelo seco y tamizado en una malla de 0.2 cm, se colocaron en un recipiente de 100 mL. Todo se realizó por triplicado para cada muestra de suelo (S1, S2 y S3). En cada recipiente de 100 mL se agregaron 20 mL de agua desionizada y se mezclaron en el agitador orbital por 1 h. posteriormente se filtraron las suspensiones utilizando papel filtro, se agregó la solución al 0.1% de $(\text{NaPO}_3)_6$ en proporción de una gota por cada 25 mL de extracto. Para la medición de la conductividad, se calibró el equipo con las soluciones estándar, posteriormente se realizaron las determinaciones de conductividad de los extractos del suelo y se tomaron los datos.

Anexo 5. Días después de la siembra en los que se regó o fertilizó cada una de las unidades experimentales del ensayo de invernadero.

Tratamiento	Aplicación de NPs (200 mL)	Aplicación de Urea ^Ø	Raleo	Aplicación de triple 17 ^Ø	Aplicación de NPs (200 mL)	Aplicación de triple 17 ^Ø
Zn-3	A la siembra	12	20	30	35	60
Zn-6	A la siembra	12	20	30	35	60
Ti-3	A la siembra	12	20	30	35	60
Ti-6	A la siembra	12	20	30	35	60
Fe-3	A la siembra	12	20	30	35	60
Fe-6	A la siembra	12	20	30	35	60
Ctrl	A la siembra	12	20	30	35	60

^Ø Se aplicó el fertilizante necesario para completar una dosis total de 180-120-120. A los 12 DDS se aplicaron 0.2 g de urea, a los 30 DDS se aplicaron 0.5 g de triple 17 y a los 60 DDS se aplicaron 0.5 g de triple 17. Para realizar los cálculos de fertilización se consideró una densidad aparente del suelo de 1.3 gcm⁻³ y una profundidad de 30 cm.