

Inoculación de nanopartículas de TiO_2 -Ag en semillas de espinaca

Inoculation of TiO_2 -Ag nanoparticles in spinach seeds

Fernando Gordillo-Delgado¹
Jakeline Zuluaga-Acosta²
Benyi-Juliana Marín-Gallego³

¹ Universidad del Quindío; (Colombia); correo: fgordillo@uniquindio.edu.co

² Universidad del Quindío (Colombia); correo: jzuluagaa@uqvirtual.edu.co

³ Universidad del Quindío (Colombia); correo: bjmaring@uqvirtual.edu.co

Recibido: 16-10-2018 Aceptado: 12-04-2019

Cómo citar: Gordillo-Delgado, Fernando; Zuluaga-Acosta, Jakeline; Marín-Gallego, Benyi (2019). Inoculación de nanopartículas de TiO_2 -Ag en semillas de espinaca. *Informador Técnico*, 83(1), 76-85.
<https://doi.org/10.23850/22565035.1659>

Resumen

La espinaca es consumida por su valioso aporte nutricional. Sin embargo, en Colombia su baja producción en cultivos, ha sido de poco interés en el área de la investigación. Por otro lado, la nanotecnología que puede ser utilizada en la agricultura para evitar o controlar enfermedades en los cultivos a través de la aplicación de nanopartículas (NPs) se perfila como un tema de alto potencial en nuestro país. En este trabajo, se evaluó la inoculación de suspensiones de NPs de dióxido de titanio con incorporación de plata (TiO_2 -Ag) en semillas de espinaca. Las NPs se sintetizaron a través del método sol-gel y se caracterizaron por medio de Difracción De Rayos X (DFR). Se obtuvieron muestras en polvo con tamaños de partícula entre 7 y 26 nm que se suspendieron en agua a diferentes concentraciones para la inoculación. En comparación con el grupo control (sin inoculación), se obtuvo un crecimiento de las plantas con NPs del tamaño más bajo y concentración del 2 %, debido a que posiblemente el TiO_2 -Ag incorporado contribuye al proceso de fotosíntesis y desempeña un papel antimicrobiano. La actividad fotosintética de las plantas tratadas, se midió mediante la técnica fotoacústica y del análisis de los resultados se obtuvo que con el tratamiento hecho con la suspensión de NPs de menor tamaño, a concentración entre 0,25 y 2 %, la Razón de Evolución de Oxígeno (REO) es similar a la que se observó en las plantas del grupo control. Esto indica que el tratamiento con NPs de TiO_2 -Ag entre 7 y 8 nm puede inducir el crecimiento sin alterar drásticamente la tasa fotosintética de plantas de espinaca a bajas concentraciones, lo que puede ser una alternativa eficiente para la mejora de la producción de este cultivo.

Palabras clave: espinaca; nanopartículas; fotoacústica; dióxido de titanio; plata; actividad fotosintética; inoculación de semillas.

Abstract

Spinach is consumed for its valuable nutritional contributions. However, in Colombia, this crop has been of little interest in the research area due to its low production. On the other hand, the nanotechnology that can be used in agriculture to prevent or control diseases in crops through the application of nanoparticles (NPs) is emerging as a high potential subject in our country. In this work, the inoculation of suspensions of titanium dioxide NPs with the incorporation of silver (TiO_2 -Ag) in spinach seeds was evaluated. The NPs were synthesized through Sol-gel method and characterized by means of X-ray diffraction; suspensions of these powder samples of grain size between 7 and 26 nm were prepared at different concentrations for inoculation. In comparison with the control group (without inoculation), highest plant growth was obtained with NPs of the lowest size and 2 % concentration. It possibly due to the contribution in the photosynthesis process and antimicrobial role of incorporated TiO_2 -Ag. The photosynthetic activity of the plants from control and treated groups was measured by the photoacoustic technique and it was found that the plants treated with the smallest NPs suspension,

at a concentration between 0.25 and 2 %, presented a rate of oxygen evolution similar to control group. These results indicate that the treatment with NPs of TiO₂-Ag between 7 and 8 nm at low concentration can improve the growth without drastic alteration of the photosynthetic rate of spinach plants, which can be an efficient alternative for improvement in crop production.

Keywords: spinach; nanoparticles; photoacoustic; titanium dioxide; silver; Inoculation of seeds.

Introducción

El consumo de hortalizas frescas en el mundo ha incrementado del 36 al 40 % en las últimas décadas, con una tasa anual de producción de 4,1 % (881 millones de toneladas) aproximadamente, en comparación con la reportada el siglo pasado de 1,7 % (324 millones de toneladas). China es el mayor contribuyente con el 50 % de la producción mundial (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* [FAO], 2018).

Así mismo, la extensión de cultivos de espinaca (*Spinace oleraceae*) ha aumentado por su valor nutricional, bajo en calorías y con un contenido elevado de agua, que aporta fibra, calcio, fósforo, hierro y vitaminas A, B1, B2 y C. Esta planta generalmente, se desarrolla a temperaturas entre 5 y 15 °C en terrenos fértiles ricos en materia orgánica y con pH neutro (Watt, 1975; Fersini, 1976; *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 2007).

En Colombia, el área sembrada de hortalizas de hoja entre ellas la espinaca, es de alrededor de 12.850 ha, distribuidas en los departamentos de la región central como Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Santander y Norte de Santander (Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE], 2015). Sin embargo, como la producción de espinaca es baja respecto al total de hortalizas de hoja (alrededor de 200 ha cultivadas anualmente), no hay suficientes manuales de manejo ni alternativas para solucionar problemas locales, específicamente los relacionados con el control de enfermedades y plagas (Sánchez, 2017).

Con relación a la nanotecnología, se aplica en la agricultura para el tratamiento de enfermedades de las plantas y en el mejoramiento de la absorción de nutrientes. Su uso puede reducir el empleo de pesticidas e insecticidas comerciales, lo que mitiga el impacto ambiental de esta actividad (Rai; Ingle, 2012). Uno de los materiales con mayor potencial para este tipo de usos es la plata (Ag), por sus características antimicrobianas (Wiesner; Lowry; Dionysiou; Biswas, 2006), mientras que el dióxido de titanio (TiO₂), se perfila como un candidato viable por su biocompatibilidad y su actividad fotocatalítica (Osborne *et al.*, 2013).

En este trabajo se evaluó el efecto de la inoculación de suspensiones de NPs de TiO₂-Ag en semillas de espinaca, a través del seguimiento y monitoreo de medidas morfológicas y de la actividad fotosintética.

Materiales y métodos

Síntesis y caracterización del TiO₂-Ag

El TiO₂-Ag se obtuvo a través del método sol-gel, este método es una ruta química que permite la fabricación de materiales amorfos y policristalinos a temperatura ambiente. Se inicia con la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido (sol), que después de un proceso de hidrólisis y condensación se transforman en un material sólido lleno de solvente (gel). Éste se evapora del gel para obtener la muestra en forma de polvo. En este caso, se mezclaron 33 mL de metanol (Merck), 5 mL de titanio bis (*acetylacetonate diisopropoxide*) (Sigma-Aldrich) al 97 % y 0,04 g de nitrato de plata (Sigma-Aldrich) al 99 % en un *beaker* con agitación constante hasta obtener una dilución completa del nitrato de plata. Después la mezcla se vertió en una caja de *Petri* manteniendo la agitación. Luego, se preparó una mezcla de agua destilada y metanol de la que se añadieron 2 mL gota a gota a la caja de *Petri* y se continuó la agitación durante 5 min. Finalmente, el producto se dejó secar a temperatura ambiente hasta obtener un sólido que se maceró y se sinterizó a temperaturas de 300, 400, 500 y 600 °C durante 1 h. Después de cada tratamiento térmico las muestras se caracterizaron mediante Difracción de Rayos X (DRX).

Se eligió el método sol-gel para la fabricación de las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, debido a que es relativamente económico, realizable en un menor tiempo, amigable con el medio ambiente y seguro. De igual forma, permite la observación de la formación del gel y la ventaja de que es posible manipular el tamaño de grano y sintetizar material en polvo de alta pureza. Este es uno de los métodos que permite producir estructuras homogéneas a escalas finas (nm) y se ha posicionado dentro de las rutas químicas para la generación de material inorgánico avanzado de alta tecnología (Hench; West, 1990; Morales; Moran; Quintana; Estrada, 2009).

Inoculación de semillas de espinaca

Las semillas de espinaca (*Spinace oleracea*) se sumergieron en suspensiones de NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ en agua destilada, previamente sometidas a ultrasonido por un periodo de 3 h. Los tratamientos se hicieron en cajas de *Petri* durante 3 d, a una temperatura promedio de 17 °C con periodos alternos de exposición lumínica natural, utilizando concentraciones de 0,25, 2, 4 y 6 % de NPs de tamaños de 7, 8, 10 y 26 nm. Después de este proceso, las semillas se dejaron sobre papel adsorbente con riego diario hasta su germinación y se trasplantaron en un sustrato hidropónico para su cultivo bajo condiciones de invernadero. La altura de las plantas se registró diariamente durante 16 días.

Actividad fotosintética

La Razón de Evolución de Oxígeno (REO) liberado en el proceso de fotosíntesis, se midió con la técnica fotoacústica (FA), que forma parte de un conjunto de métodos experimentales que se conocen como fototérmicos, en los que periódicamente se inciden pulsos de luz sobre la muestra, cuya energía es absorbida parcialmente y transformada en calor, de tal forma, que la temperatura de la muestra, y por lo tanto, la presión del aire adyacente, cambian con la misma frecuencia de la radiación incidente. El sonido que se genera puede ser captado por un micrófono y se conoce como señal FA; teniendo en cuenta que durante este proceso pueden suceder fenómenos fotoquímicos como la fotosíntesis, la contribución se suma a la señal FA. Esto permite la determinación de la actividad fotosintética usando una celda FA.

En el montaje experimental, la hoja de la planta viva se colocó sellando la cavidad de la celda y se le hizo incidir luz roja pulsada sobre su haz, mientras que por el envés se irradió temporalmente con una luz blanca para saturar el proceso de la fotosíntesis cada 30 s. La señal FA se adquirió a través de un amplificador "lock-in" SR830 y se registró en función del tiempo a través de una interfaz y un computador. El efecto fotoacústico se produce cuando la radiación modulada es absorbida por la hoja de espinaca, pero la intensidad del sonido no depende solamente de las características ópticas y térmicas, sino también de la generación periódica de oxígeno. Por ello, de las curvas que se obtienen saturando el proceso de fotosíntesis se determina el porcentaje de oxígeno a generar periódicamente. De igual forma, como la fisiología de las plantas es afectada por las condiciones de cultivo, con esta técnica se puede evaluar la influencia que tiene un tratamiento determinado a través del monitoreo de la actividad fotosintética.

Resultados y discusión

Caracterización con Difracción de Rayos X (DRX)

Se analizó la estructura de las NPs de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ utilizando DRX en el rango de 2θ entre 20 y 80°. Es una de las configuraciones más utilizadas para muestras policristalinas en forma de polvo, de películas delgadas o multicapa, llamada geometría *Bragg-Brentano* (Quiroz, 2014). En los difractogramas se observó que los picos de difracción de *Bragg* concuerdan con los reportados por Hernández (2010), indicando la presencia de TiO_2 en fase anatasa, lo que es favorable para la fotocatalisis (Macías; García; De La Torre; Chávez, 2000) y se observaron variaciones del ancho de los picos que dependen del tamaño promedio del cristal (Macak *et al.*, 2007), el cual se estimó con la fórmula de *Scherrer* (Villar; Bonilla, 2015). Por otro lado, los tamaños de grano de las muestras sinterizadas a 600, 500, 400 y 300 °C fueron de $26,0 \pm 0,6$, $10,9 \pm 0,4$, $8,3 \pm 0,4$ y $7,3 \pm 0,1$ nm, respectivamente. Este comportamiento con el aumento de la temperatura de sinterización corresponde a un fenómeno de coalescencia (Mosquera; Rosas; Debut; Guerrero, 2015).

Crecimiento de las plantas

Los resultados de la medición de la altura de las 10 plantas de espinaca de cada tratamiento se muestran en la Figura 1. Se observó que las plantas tratadas con NPs de 7 nm, a una concentración de 2 %, alcanzaron 89 % más de altura que las de control. Este resultado concuerda con el estudio realizado por Martínez (2015), quien encontró que la aplicación de concentraciones bajas de NPs de TiO_2 influye en el crecimiento y desarrollo de plantas de maíz, teniendo efecto en la biomasa y la micromorfología, en función del tipo de NPs y de la concentración aplicada. Por su parte, Yang *et al.*, (2007), suministraron NPs de TiO_2 en fase anatasa en el suelo, con concentraciones en el rango 2,5 - 40 g kg^{-1} , y obtuvieron un rendimiento promedio de la espinaca en un 95 % superior al control, lo que relacionaron con un efecto de optimización en la fijación de nitrógeno. Se ha demostrado que el TiO_2 incrementa la actividad de varias enzimas responsables de las reacciones metabólicas (Capaldi; Diniz; Moretto; Antunes; Zezzi, 2015) y facilita la absorción de nutrientes, lo que mejora la velocidad de germinación, debido a que favorece la formación de Ácido Indol Acético (AIA) en las raíces o brotes que pueden incrementar el vigor de la semilla y el crecimiento de las plántulas (Krishnaraj; Ji; Harper; Yun, 2016).

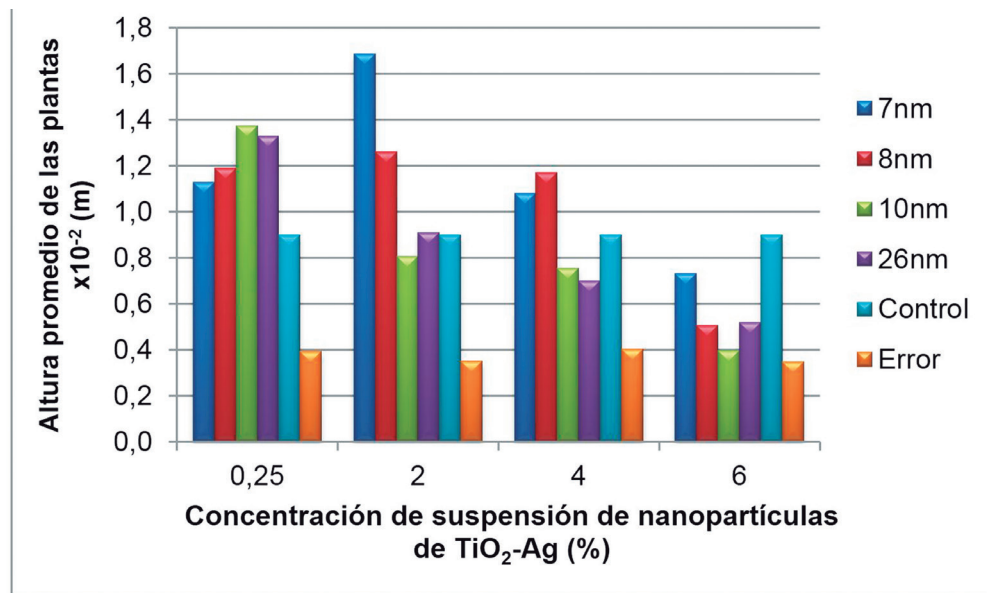


Figura 1. Altura promedio de las plantas de espinaca, a los 16 días de haber sido sembradas, luego de la inoculación con suspensiones de nanopartículas de dióxido de titanio incorporado con plata (NPs $\text{TiO}_2\text{-Ag}$) con diferentes tamaños de partícula y concentración
Fuente: elaboración propia

Aun cuando en este trabajo el contenido de plata en las suspensiones inoculadas fue bajo, se ha demostrado que este elemento tiene propiedades antibacterianas, que inhiben el crecimiento de *staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa* y *escherichia coli* (Stockmann; Sherwin; Ampofo; Spigarelli, 2014), que afectan el crecimiento de las plantas y son reportados como unos de los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (Figueroa; Navarrete; Caro; Troncoso; Faúndez, 2002; Luján, 2014; Ocaña de Jesús *et al.*, 2017).

Por otra parte, con relación a la ecotoxicidad que se puede generar en el suelo por el empleo de NPs en la agricultura, algunos autores han reportado repercusiones en la composición microbiana, tales como generación de desequilibrio ecológico y afectación a la población de bacterias promotoras de crecimiento, fundamentales en la producción agrícola. Las NPs pueden causar lisis celular, producción de especies de oxígeno reactivas en ubicación intracelular, producción de estrés oxidativo, lesiones del Ácido desoxirribonucleico (ADN), alteración de los mecanismos de transporte a través de las membranas y desnaturalización de biomacromoléculas (Shah; Belozeroova, 2009; Fang; Shan; Wen; Lin; Owens, 2009; Nowack, 2009; Somasundaran; Fang; Ponnuram; Li, 2010; Gutarowska; Skora; Zduniak; Rembisz, 2012). Sin embargo, se ha concluido en la mayoría de estudios que la ecotoxicidad de las NPs depende de las concentraciones utilizadas (Zhang; Niu Yan; Cai, 2011; Gutarowska *et al.*, 2012). Por ello, en este trabajo la inoculación de las NPs se hizo directamente en las semillas y se evitó el depósito NPs en el suelo y aunque existen reportes que confirman que tanto las NPs de TiO_2 como

de plata, a bajas concentraciones y tamaños de partícula no son tóxicas para el ser humano (Weir; Westerhoff; Fabricius; Hristovski; Von Goetz, 2012; Vladimir, 2012), es necesario hacer estudios correspondientes con las plantas tratadas antes de definir el uso del producto en campo.

No obstante, es necesario resaltar que el TiO_2 ha sido aprobado para el consumo humano desde 1960 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, y posteriormente en Europa por el Comité Científico en Alimentos bajo la nomenclatura E171 (FAO; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2011). Actualmente El Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSHT) de los Estados Unidos recomienda límites de exposición en relación con las partículas extrafinas de TiO_2 : $0,3 \text{ mg/m}^3$ para NPs de TiO_2 ($< 100 \text{ nm}$), frente a $2,4 \text{ mg/m}^3$ para partículas finas ($> 100 \text{ nm}$) (El Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo [NIOSH], 2011).

Razón de Evolución de Oxígeno (REO)

El comportamiento de la amplitud de la señal FA proveniente de las hojas de las plantas se muestra en la Figura 2. Estas curvas son el promedio de las mediciones de 10 plantas, las cuales se escogieron al azar de los grupos de cada tratamiento y fueron tomadas 20 d después de sembradas. En ellas se observó el componente fototérmico de la señal, adicionada a la correspondiente liberación de oxígeno (componente fotobárica). Esta última dejó de contribuir cuando se hizo incidir la luz blanca continua, ya que saturó el proceso fotosintético. Por lo tanto, se evidenció que al encender esta luz, la señal cae abruptamente y se restablece cuando se apaga. La REO se calcula como el porcentaje de decrecimiento o aumento de este voltaje.

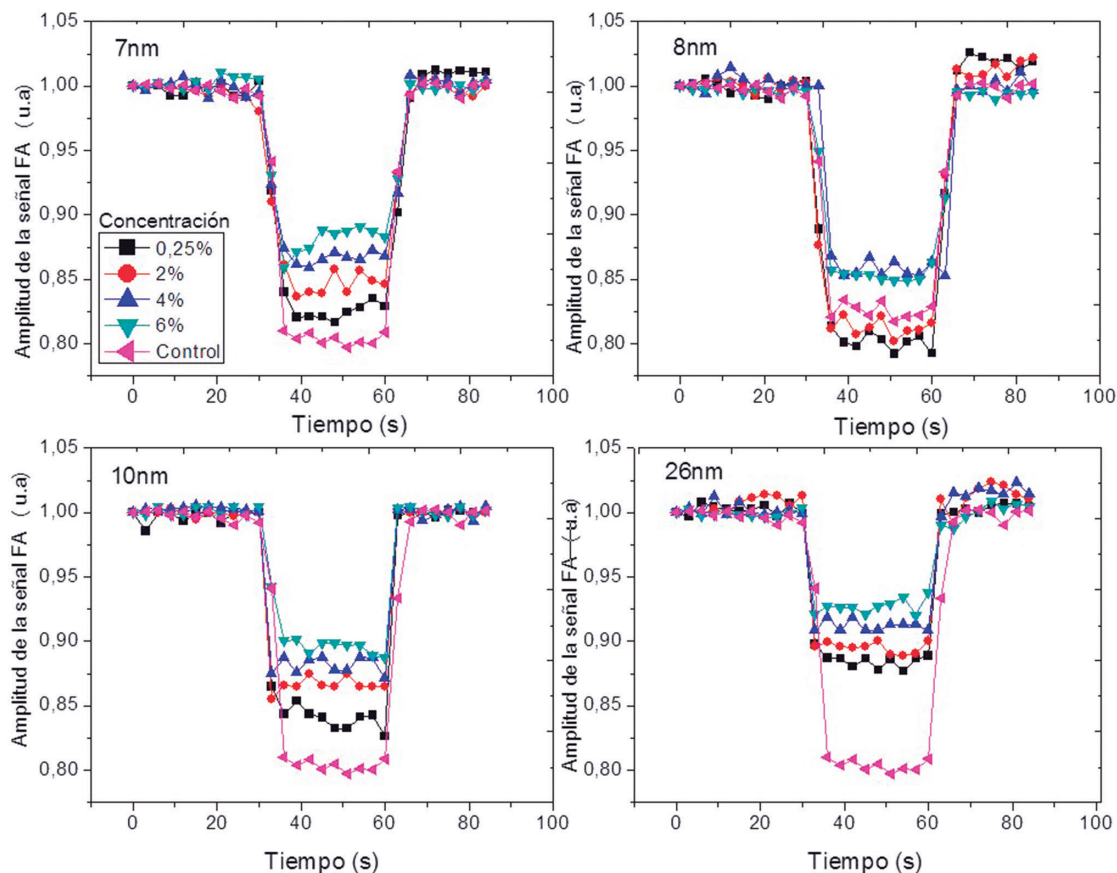


Figura 2. Amplitud de la señal fotoacústica en función del tiempo, correspondiente a las plantas de los tratamientos con nanopartículas de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y del grupo control
Fuente: elaboración propia

La amplitud de la señal se muestra en la Figura 3, en donde se evidencia que el comportamiento de ésta fue cercano al del grupo control con la suspensión de tamaño promedio de 8 nm y concentración de 2 %, mientras que con el mayor tamaño de partícula (26 nm), el comportamiento de la señal FA se alejó del de control, proporcionalmente con el aumento de la concentración. Es decir que las plantas reaccionaron de manera positiva al tratamiento con las NPs de tamaño menor a 10 nm y concentraciones menores a 4 %, ya que no se ve afectado el metabolismo normal de la planta. Esto corresponde a lo encontrado por Bradfield (2015), quien en su estudio demostró que la aplicación foliar de 0,25 % de TiO₂ (2500 mg L⁻¹) aumentó la biomasa de espinaca, lo que fue atribuido al aumento de la tasa fotosintética o al mantenimiento de la misma en presencia del tratamiento.

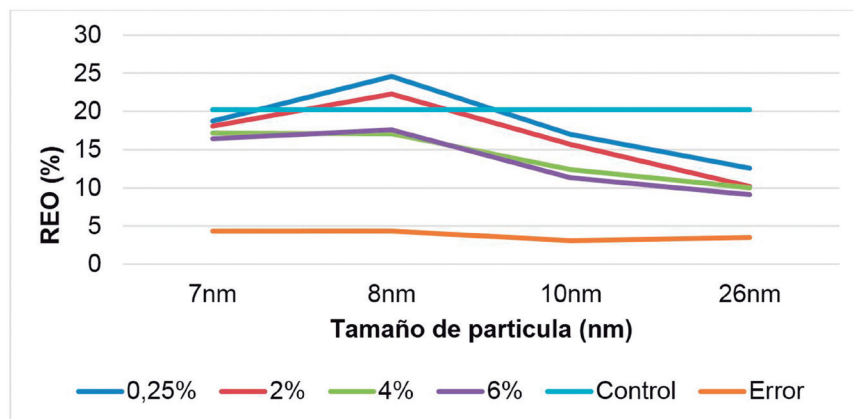


Figura 3. Razón de Evolución de Oxígeno de las plantas del grupo control y de las tratadas con las nanopartículas de TiO₂-Ag.
Fuente: elaboración propia

Por su parte, Ze; Liu; Wang; Hong; Hong (2010), determinaron los mecanismos por los cuales las NPs de TiO₂ pueden favorecer la fotosíntesis, para ello, utilizaron como objeto de estudio *arabidopsis thaliana*. Las plantas fueron rociadas con 0,25 % de NPs TiO₂ y concluyeron que este compuesto puede inducir el aumento significativo de la expresión de los genes que codifican para el complejo de captación de luz II (*light harvesting complex II* - LHCII), ya que las NPs podrían estar acelerando la velocidad de transporte de los electrones de la cadena entera y la transformación de la energía luminosa en energía electrónica. Asimismo, podrían promover la absorción de la luz de cloroplastos.

Por tanto, se puede suponer que la fotosíntesis de las plantas de espinaca también puede estar siendo influenciada por la inoculación de este fotocatalizador (TiO₂), teniendo en cuenta que al incorporarse a la planta puede eventualmente absorber luz solar, que excita a los electrones hasta ganar suficiente energía para saltar de la Banda de Valencia (BV) a la Banda de Conducción (BC) y los portadores de carga generados pueden migrar a la superficie para reaccionar con moléculas adyacentes. En soluciones acuosas, los huecos fotogenerados en la BV del TiO₂ forman radicales OH, mientras que los electrones en la BC reducen el oxígeno disuelto (Kazuya; Tsuyoshi; Taketoshi; Akira, 2012; Quiroz, 2014). Estas especies, en particular los radicales OH, tienen un alto potencial de oxidación que actúa sobre el dióxido de carbono y el agua (Ollis; Ekabi, 1993), lo que puede acelerar el proceso fotosintético. De igual forma, Hong *et al.*, (2005) y Zheng *et al.*, (2008), indicaron que las propiedades de las NPs de TiO₂ para aumentar la capacidad fotosintética, provienen de su habilidad para disminuir las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en los cloroplastos de espinaca.

También, se ha comprobado que después de 24 h de exposición a 4 mM (319 mg L⁻¹) de NPs de TiO₂, se incrementan los niveles de Malondialdehído (MDA) en las raíces de cebolla. El MDA es un indicador de peroxidación lipídica porque es el producto de la descomposición de los poliinsaturados y ácidos grasos que se encuentran en las biomembranas. Esto indica que las NPs de TiO₂ a estas concentraciones aumentan la generación de ERO que conducen a una mayor peroxidación de lípidos y estrés oxidativo (Ghosh; Bandyopadhyay; Mukherjee, 2010).

Asimismo, se ha determinado que el contenido de MDA en algas que crecen en contacto con las NPs de TiO₂ es significativamente mayor al control. Esto muestra que las NPs de TiO₂ podrían imponer estrés oxidativo sobre las células de algas, dependiendo la concentración (Lin; Ji; Long; Yang; Wu, 2012). Por lo tanto, se considera que el TiO₂ en altas concentraciones de mayor a 1 g/L que puede inducir estrés en las plantas, llegando a cambiar la estructura y constitución

de la pared y membrana celular (Liu; Lin; Zhao, 2013), lo que altera la eficiencia fotosintética, debido a las interacciones de estas NPs con los fotosistemas, ya que la clorofila puede transferir energía a las NPs (Olejnik *et al.*, 2013; Rico; Peralta-Videa; Gardea-Torresdey, 2015).

Conclusión

El tratamiento con nanopartículas de TiO₂-Ag en polvo con tamaños de partícula entre 7 y 8 nm y a concentraciones entre 0,25 y 2 %, tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de plantas de espinaca en condiciones de invernadero, sin alterar drásticamente el metabolismo natural de la planta, ya que la razón de evolución de oxígeno de las plantas tratadas es muy similar a la de los individuos del grupo control.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede afirmar que tanto el tratamiento descrito, como el método de medición de este parámetro fotosintético, tienen potencial para convertirse en herramientas para el mejoramiento de cultivos y evaluación de nuevos productos.

Referencias

- Bradfield, S. (2015). *Influence of TiO₂ engineered nanoparticles on photosynthetic efficiency and contaminant uptake* (Tesis doctoral). Southern Illinois University Carbondale, Illinois.
- Capaldi, S.; Diniz, A.; Moretto, R.; Antunes, R.; Zezzi, M. (2015). Nanoparticles applied to plant science. A review. *Talanta*. 131, 693-705.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2007). Multistate outbreaks of Salmonella infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants. United States, 2005-2006. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 56(35), 909-911.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (2015). *Boletín técnico. Encuesta Nacional Agropecuaria*. (ENA 2015). Recuperado de:
https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2015/boletin_ena_2015.pdf
- Fang, J.; Shan, X.; Wen, B.; Lin, J.; Owens, G. (2009). Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environmental pollution*, 157(4), 1101-1109.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.006>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). *World Food and Agriculture, Statistical Pocketbook*. Rome, 254pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations y Organización Mundial de la Salud (2011). *Reunión conjunto de FAO/OMS de Expertos acerca de la aplicación de la nanotecnología en los sectores alimentario y agropecuario: posibles consecuencias para la inocuidad de los alimentos*. (Informe de la reunión 2011). Recuperado de: <http://www.fao.org/3/i1434s/i1434s00.pdf>
- Fersini, A. (1976). *Horticultura práctica*. Edit. Diana (2ª ed.). México
- Figueroa, G.; Navarrete, P.; Caro, M.; Troncoso, H.; Faúndez, G. (2002). Portacion de Staphylococcus aureus enterotoxigénicos en manipulación de alimentos. *Revista médica de Chile*, 130(8), 859-864.
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872002000800003>

- Ghosh, M.; Bandyopadhyay, M.; Mukherjee, A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10), 1253-1262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.022>
- Gutarowska, B.; Skora, J.; Zduniak, K.; Rembisz, D. (2012). Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.12.002>
- Hench, L. L.; West, J. K. (1990). The sol-gel process. *Chemical reviews*, 90(1), 33-72. <https://doi.org/10.1021/cr00099a003>
- Hernández, C. (2010). *Estudio de la actividad catalítica del dióxido de titanio soportado en alúmina en la síntesis de ozono a partir de oxígeno por el método de descarga silenciosa*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional De Colombia, Bogotá, Colombia.
- Hong, F.; Zhou, J.; Liu, C.; Yang, F.; Wu, C.; Zheng, L.; Yang, P. (2005). Effect of Nono-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological trace element research*, 105(1-3), 269-279. <https://doi.org/10.1385/BTER:105:1-3:269>
- Kazuya, N.; Tsuyoshi, O.; Taketoshi, M.; Akira, F. (2012). Photoenergy conversion with TiO₂ photocatalysis: New materials and recent applications. *Electrochimica Acta*, 84, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.035>
- Krishnaraj, C.; Ji, B. J.; Harper, S. L.; Yun, S. I. (2016). Plant extract-mediated biogenic synthesis of silver, manganese dioxide, silver doped manganese dioxide nanoparticles and their antibacterial activity against food and water borne pathogens. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(5), 759-772. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1556-2>
- Lin, D.; Ji, J.; Long, Z.; Yang, K.; Wu, F. (2012). The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Chlorella* sp. *Water research*, 46(14), 4477-4487. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.035>
- Liu, K.; Lin, X.; Zhao, J. (2013). Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors. *International journal of nanomedicine*, 8, 2509-2520.
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), 465-474.
- Macak, J. M.; Tsuchiya, H.; Ghicov, A.; Yasuda, K.; Hahn, R.; Bauer, S.; Schmuki, P. (2007). TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 11(1-2), 3-18. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2007.08.004>
- Macías, L.; García, M.; De La Torre, I.; Chávez, A. (2000). Cuantificación de fases en óxidos de titanio por medio de difracción de rayos X. En *Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN*. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, México. Recuperado de: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/33/013/33013257.pdf?r=1&r=1
- Martínez, L. A. (2015). *Micromorfología de tallo y raíz de plantas de maíz y frijol tratadas con nano partículas de titanio, hierro y zinc, bajo invernadero* (Tesis de grado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México. Recuperado de:

<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6844/T20520%20MARTINEZ%20RODRIGUEZ%2c%20LUIS%20ALBERTO%20%2063436.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Morales, J.; Moran, J.; Quintana, M.; Estrada, W. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta Sol-Gel a partir de Nitrato de plata. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(2), 177-184
- Mosquera, E.; Rosas, N.; Debut, A.; Guerrero, V.H. (2015). Síntesis y caracterización de nano partículas de dióxido de titanio obtenidas por el método Sol-Gel. *Revista Politécnica*, 36(3), 7.
- National Institute for Occupational Safety and Health (2011). *Occupational exposure to titanium dioxide*. Current Intelligence. (Bulletin 63, 2011). Recuperado de:
<https://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>
- Nowack, B. (2009). The behaviour and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental pollution*, 157(4), 1063-1185.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.019>
- Ocaña de Jesús, R.; Gutiérrez, I.; Sánchez, P.; Barsain, M.; Campos, C.; Laguna, A. (2017). Persistencia, internalización y translocación de Escherichia coli O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (Solanum lycopersium L). *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 408-416.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.001>
- Olejnik, M.; Krajnik, B.; Kowalska, D.; Twardowska, M.; Czechowski, N.; Hofmann, E.; Mackowski, S. (2013). Imaging of fluorescence enhancement in photosynthetic complexes coupled to silver nanowires. *Applied Physics Letters*, 102(8), 083703.
<https://doi.org/10.1063/1.4794171>
- Ollis, D.F.; Ekabi, H. (1993). *Photocatalytic purification and treatment of water and air*. Elsevier: Amsterdam.
- Osborne, O.J.; Johnston, B. D.; Moger, J.; Balousha, M.; Lead, J. R.; Kudoh, T.; Tyler, C. R. (2013). Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (Danio rerio) embryos. *Nanotoxicology*, 7(8), 1315-1324.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2012.737484>
- Quiroz, H. (2014). *Preparación y estudio de las propiedades estructurales, ópticas y morfológicas de nanotubos de TiO₂ para su aplicación en sensores ópticos* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 23-36 pp
- Rai, M.; Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 287-293.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-3969-4>
- Rico, C. M.; Peralta-Videa, J. R.; Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. In Siddiqui M., Al-Whaibi M., Mohammad F. (Eds.) *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 1-17). Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0_1
- Sánchez, J. (2017). Mercado de productos agrícolas ecológicos en Colombia. *Suma de negocios*, 8(18), 156-163.
<https://doi.org/10.1016/j.sumneg.2017.10.001>
- Shah, V.; Belozeroval, I. (2009). Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197(1-4), 143-148.
<https://doi.org/10.1007/s11270-008-9797-6>

- Somasundaran, P.; Fang, X.; Ponnuram, S.; Li, B. (2010). Nanoparticles: characteristics, mechanisms and modulation of biotoxicity. *KONA powder and particle journal*, 28, 38-49. <https://doi.org/10.14356/kona.2010007>
- Stockmann, C.; Sherwin, C. M.; Ampofo, K.; Spigarelli, M. G. (2014). Development of levofloxacin inhalation solution to treat *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 8(1), 13-21. <https://doi.org/10.1177/1753465813508445>
- Villar, M.; Bonilla, M. A. (2015). *Obtención y caracterización de nanopartículas de LiMn_2O_4 , $\text{LiMn}_{1.5}\text{Fe}_{0.5}\text{O}_4$ y $\text{LiMn}_{1.25}\text{Fe}_{0.75}\text{O}_4$* (Tesis de maestría). Universidad Tecnológica de Puebla. Puebla, México.
- Vladimir, M. (9 de mayo de 2011). Titanium Dioxide: A Changing Paradigm in Occupational Risk Management. (Blog). Recuperado de: <http://blogs.cdc.gov/niosh-science-blog/2011/05/09/TiO2>
- Watt, B. K. (1975). *Composition of Foods. Agricultural handbook*. Washington DC, U. S. Dep of Agric.
- Weir, A.; Westerhoff, P.; Fabricius, L.; Hristovski, K.; Von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology*, 46(4), 2242-2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>
- Wiesner, M. R.; Lowry, G. V.; Dionysiou, P.; Biswas, P. (2006). Assessing the risk of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 40(14), 4336-45. <https://doi.org/10.1021/es062726m>
- Yang, F.; Liu, C.; Gao, F.; Su, M.; Wu, X.; Zheng, L.; Hong, F.; Yang, P. (2007). The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO_2 treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biological trace element research*, 119(1), 77-88. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-0046-4>
- Ze, Y.; Liu, C.; Wang, L.; Hong, M.; Hong, F. (2010). The regulation of TiO_2 nanoparticles on the expression of light-harvesting complex II and photosynthesis of chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Biological trace element research*, 143(2), 1131-1141. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8901-0>
- Zhang, X.; Niu, H.; Yan, J.; Cai, Y. (2011). Immobilizing silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375(1-3), 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.009>
- Zheng, L.; Mingyu, S.; Xiao, W.; Chao, L.; Chunxiang, Q.; Liang, C.; Hao, H.; Xiaoqing, L.; Fashui, H. (2008). Antioxidant Stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research*, 121(1), 69-79. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8028-0>