

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DEL SUELO**



RESPUESTA FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS POR LA EXPOSICIÓN A  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y PLATA EN LA GERMINACIÓN DE  
*Cucumis sativus L.*

**POR:**

**LILIANA LÓPEZ HERNÁNDEZ**

**TESIS:**

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRÍCOLA Y AMBIENTAL**

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre del 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DEL SUELO

RESPUESTA FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS POR LA EXPOSICIÓN A  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y PLATA EN LA GERMINACIÓN DE

*Cucumis sativus L.*

POR:

**LILIANA LÓPEZ HERNÁNDEZ**

TESIS:

Que se somete a consideración del h. jurado examinador como requisito parcial  
para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÍCOLA Y AMBIENTAL**

Aprobada por el comité de asesoría:



M.C. Alejandra Escobar Sánchez  
Asesor principal



Dra. Ileana Vera Reyes  
Asesor principal externo



Dra. Yolanda Ortega Ortega  
Co-asesor externo



M.C. Sergio Sánchez Martínez  
Coordinador de la división de ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Noviembre, 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

**A dios.** *Por dejarme recorrer un camino iluminado de sabiduría, alegría y salud, te agradezco Dios por esta vida plena de satisfacciones que solo tú puedes darme con amor.*

**A mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.**

*Estoy muy agradecida con mi **Alma Terra Mater** por haberme abierto las puertas y brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente, para mí es un gran privilegio haber podido formar parte de ella, me llevo las mejores experiencias y cada uno de los momentos inolvidables los atesoro en mi corazón.*

**Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA).**

*Por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y ser testigo de haber cumplido una de mis grandes metas.*

**A la Dra. Ileana Vera Reyes.**

*Estoy muy agradecida por todo el apoyo incondicional que me brindó al realizar este proyecto, por la paciencia y confianza que tuvo en mí, sobre todo por el tiempo que me dedicó, las grandes enseñanzas que llevo es gracias a usted.*

**A la Ing. Angélica Cardiel.**

*Por su gran apoyo, amabilidad y cortesía que me ofreció durante la elaboración de este proyecto.*

**A la M.C Alejandra Escobar Sánchez.**

*Gracias por todo el apoyo que me brindó en la elaboración de este proyecto y sobre todo durante mi formación académica, por sus buenos consejos.*

**A la Dra. Yolanda Ortega Ortega.**

*Estoy muy agradecida por su valioso apoyo y dedicación a este proyecto*

**Al M.C Ángel Sánchez**

*Agradezco su apoyo durante la instancia que estuvo en CIQA, el tiempo y paciencia al realizar una parte del experimento y sobre todo por compartir de sus conocimientos.*

## DEDICATORIA

### **A mi madre**

**Jaqueline Hernández López** eres ese ángel de la guarda que todos tienen, pero tu mamá, sin duda eres única, porque a pesar de la distancia, de no poder verte ni escucharte te haces notar en cada cosa buena que me sucede, en cada logro y cada momento de fortaleza. Desde aquí te dedico todos mis triunfos y encuentro paz en mis derrotas, pues sé que, aunque no sea físicamente si estás ahí para reconfortarme y darme las fuerzas cada vez que las necesite. Te doy gracias por darme la vida, por cada momento increíble, por cada abrazo, por cada sonrisa inspiradora, por ser esa persona solidaria y hermosa y mi ejemplo a seguir. Porque intento seguir tus pasos, intento seguir luchando sin verte aquí gracias mamá te amo.

### **A mi padre**

**Edilberto López Hernández** le doy gracias a usted papá por todo el apoyo y amor que me ha brindado, por sus sabios consejos y por estar siempre a mi lado.

### **A mis hermanos**

**Víctor Jesús López Hernández** gracias por ser el mejor hermano y amigo que pude tener, por el apoyo que me has brindado y por cada momento de alegría que hemos compartido, te adoro hermano.

**Adrián López Hernández** estoy muy agradecida contigo que, aunque estés lejos nos une el amor de hermanos.

### **A mis hermanas**

**Ing. Guadalupe Yadira López Hernández**, gracias por estar en el momento que más necesite de ti, todo el amor y apoyo que me brindaste para levantarme y seguir adelante, por cada momento de soldad, tristeza y alegría siempre has estado aquí conmigo, por los buenos consejos que me has brindado.

**Alvi Julita López Hernández**, gracias preciosa por estar siempre a mi lado y brindarme tu apoyo en cada momento que lo he necesitado, por escucharme siempre y aconsejarme.

### **A mis amigos**

Rocío Romero, José Luis Arteaga, Abraham, Alex, Ixtlico, Marco, Fabiola y Erika gracias por el apoyo y su valiosa amistad durante toda la carrera, por esos momentos de convivencia que compartimos los llevaré siempre en mi mente y en mi corazón como esa familia que formamos al estar lejos de nuestros seres queridos, los estimo demasiado y deseo que esta amistad perdure para siempre.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN .....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS .....	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
1.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1.- NANOTECNOLOGÍA.....	4
1.2.- LA NANOTECNOLOGÍA EN LA AGRICULTURA.....	6
1.3.- NANOPARTICULAS METÁLICAS:.....	8
1.4.- ABSORCIÓN, TRANSLOCACIÓN Y EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA PLANTA.....	9
1.5.- NANOPARTÍCULAS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO.....	10
1.5.1.- NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC.....	10
1.5.2.- NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	14
1.6.- ESTRÉS OXIDATIVO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	18
1.7.- IMPORTANCIA DEL PEPINILLO EN MÉXICO.....	20
2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	21
2.2 MATERIAL VEGETAL.....	21
2.3.- PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO Y Ag.....	21
2.4 PRUEBA DE GERMINACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NPsAg Y NPsZnO.....	21
2.4.1 CURVA DE IMBIBICIÓN.....	21
2.4.2 GERMINACIÓN ESTÁNDAR.....	23
2.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS SOBRE EL ESTADO DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	25
2.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA.....	25
2.6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROLINA.....	25
2.6.2 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A Y B.....	26
2.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	27
2.8 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE.....	27
2.8.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.....	27
2.8.2 ACTIVIDAD DE ASCORBATO PEROXIDASAS.....	28
2.8.3 ACTIVIDAD DE CATALASAS (CAT).....	28
2.8.4. ZIMOGRAMAS EN GELES NATIVOS.....	28
2.8.4.1 CATALASA.....	28
2.8.4.2 GUAYACOL PEROXIDASA.....	29
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	30

<b>3.2 ENSAYO DE GERMINACIÓN CON NPsZnO</b> .....	31
<b>3.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA</b> .....	35
<b>3.3.1 CUANTIFICACIÓN DE PROLINA CON NPsZnO</b> .....	35
<b>3.3.2 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA</b> .....	36
<b>3.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE</b> .....	37
<b>3.5 ENSAYO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE PEPINO BAJO ESTRÉS POR NPsAg</b> .....	42
<b>3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA</b> .....	46
<b>3.6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROLINA</b> .....	46
<b>3.6.2 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA</b> .....	47
<b>3.7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE</b> .....	49
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	54
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	55
<b>6. ANEXOS</b> .....	70
<b>Anexo 1. Curva de imbibición</b> .....	70
<b>Anexo 2. Curva de calibración de proteína</b> .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> . Representación gráfica de la escala manométrica. Tomada de: Padilla-Vaca (2018).....	4
<b>Figura 2</b> . Aplicaciones potenciales de la nanotecnología en la agricultura, incluyendo la fabricación de nanosensores, nanofertilizantes, nanopesticidas y nanoherbicidas. Tomada de: (Lira-Saldivar et al., 2016).....	7
<b>Figura 3</b> . Análisis de las NPsZnO y NPsAg. Micrografías obtenidas en un microscopio electrónico de transmisión que muestran las nanopartículas de óxido de zinc (A) y plata (C). Gráficas que muestran la distribución de tamaño de las nanopartículas (B) óxido de zinc y (D) plata.....	30
<b>Figura 4</b> . Zimograma de la actividad de las isoenzimas A) catalasa y B) guayacol peroxidasa, de plántulas de <i>Cucumis sativus</i> L. expuestas a NPsZnO.....	40
<b>Figura 5</b> . Zimograma de la actividad de las isoenzimas A) catalasa y B) guayacol peroxidasa, del cultivo de <i>Cucumis sativus</i> L. tratadas con NPsAg.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Efectos fisiológicos de nanopartículas de ZnO en diferentes especies de plantas.....	12
<b>Tabla 2</b> . Efectos fisiológicos de nanopartículas de Ag en diferentes especies de plantas. ....	17
<b>Tabla 3</b> . Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semilla de <i>Cucumis sativus</i> L. embebidas en suspensiones de NPsZnO.....	31
<b>Tabla 4</b> . Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de longitud de semilla de <i>Cucumis sativus</i> L. embebidas en suspensiones de NPsZnO .....	33
<b>Tabla 5</b> . Cuantificación de prolina en plántulas de <i>Cucumis sativus</i> L. tratadas con NPsZnO.....	35
<b>Tabla 6</b> . Cuantificación de clorofila de plántulas <i>Cucumis sativus</i> L. tratadas con NPsZnO. ....	37
<b>Tabla 7</b> . Contenido de proteína total de plantulas <i>Cucumis sativus</i> L. bajo el efecto de NPsZnO... ..	38
<b>Tabla 8</b> . Actividades enzimáticas antioxidante de plántulas de <i>Cucumis sativus</i> L. expuestas a NPsZnO.....	39
<b>Tabla 9</b> . Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semilla de <i>Cucumis sativus</i> L. embebidas en suspensiones de NPsAg. ....	43

<b>Tabla 10.</b> Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semilla de <i>Cucumis sativus</i> L. embebidas en suspensiones de NPsAg.....	44
<b>Tabla 11.</b> Cuantificación de prolina en plántulas de <i>Cucumis sativus</i> L. expuesta a NPsAg.....	46
<b>Tabla 12.</b> Cuantificación de clorofila en plantulas de <i>Cucumis sativus</i> L. bajo estrés con NPsAg...	48
<b>Tabla 13.</b> Efecto de las NPsAg en el contenido de proteína de plántulas <i>Cucumis sativus</i> L.....	50
<b>Tabla 14.</b> Cuantificación de actividad enzimáticas antioxidantes de plántulas de <i>Cucumis sativus</i> L. expuestas a NPsAg.....	51

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron los efectos de las nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y nanopartículas de plata (NPsAg) en la fisiología de semillas de *Cucumis sativus* L., las cuales se trataron por separado con suspensiones de nanopartículas a diferentes concentraciones (0, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>). El tamaño de partícula promedio fue de 25 nm para las NPsZnO y de 9 nm para las NPsAg.

Los resultados obtenidos, mostraron que el tratamiento con NPsZnO incrementó 5.2 veces más el porcentaje de germinación ( $100 \pm 0$  %G) y 6.4 veces ( $77.6 \pm 3.25$  %G) el porcentaje de vigor a la concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> y 50 mg L<sup>-1</sup>, comparado con el control ( $94.8 \pm 3.56$  % G,  $71.2 \pm 2.33$  % VG), mientras que a 200 mg L<sup>-1</sup> disminuyó el porcentaje de germinación 14 veces ( $80.6 \pm 3$  %G) comparado con el control ( $94.8 \pm 3.56$  %G), lo cual indica efecto tóxico en las plántulas debido al incremento en el contenido de prolina en vástago y raíz ( $39.98 \pm 1.07$  mg·g<sup>-1</sup>;  $20.37 \pm 0.72$  mg·g<sup>-1</sup>) y una disminución del 1.88 % en el contenido de clorofila total. Además de inducir la capacidad enzimática antioxidante mediante el incremento de la actividad de CAT, APX y POD.

El tratamiento de NPsAg, a 100 mg L<sup>-1</sup> se obtuvo el mejor porcentaje de vigor de germinación al incrementar 7.2 % ( $85.60 \pm 2.04$  %VG) con respecto del control ( $78.40 \pm 2.04$  %VG), debido al aumento de la longitud de la raíz y del vástago 13 y 5 veces respectivamente ( $17.14 \pm 0.34$  cm;  $7.21 \pm 0.1$  cm) con respecto del control ( $4.67 \pm 0.24$ cm;  $5.42 \pm 0.21$  cm). Además de incrementar el contenido de clorofila 3.53 veces ( $5.36 \pm 0.51$  mg·g<sup>-1</sup>). Sin embargo, presenta un comportamiento similar a las NPsZnO a 200 mg L<sup>-1</sup> al disminuir el porcentaje germinación y vigor de germinación aproximadamente 6 veces ( $94 \pm 2.52$  %G;  $83.20 \pm 2.33$ %VG) comparado con el control ( $100$  %G;  $78.40 \pm 2.04$ %VG), posiblemente a causa de un efecto de toxicidad ya que se incrementó la cantidad en prolina tanto en vástago ( $29.85 \pm 0.61$  mg·g<sup>-1</sup>) como en la parte radicular ( $22.71 \pm 0.7$  mg·g<sup>-1</sup>), 1.18 y 1.77 veces mayor respectivamente, al mismo tiempo que el contenido de clorofila total disminuyó 2.55 veces ( $3.06 \pm 0.49$  mg g<sup>-1</sup>) con respecto al mejor tratamiento de 100

mg L<sup>-1</sup> ( $5.61 \pm 0.68 \text{ mg g}^{-1}$ ), sin alcanzar los valores del control ( $1.83 \pm 0.07 \text{ mg g}^{-1}$ ). Esta respuesta fue acompañada de la activación enzimática antioxidante de la CAT y APX e inhibición de la actividad de POD.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que los mecanismos de defensa de se activaron mediante la adición de diferentes concentraciones de nanopartículas, pero por encima de 100 mg L<sup>-1</sup> estas tienen efectos fitotóxicos al ser adicionadas a las semillas de *Cucumis sativus*. L.

**Palabras clave:** nanotecnología, NPsZnO, NPsAg, estrés oxidativo.

## INTRODUCCIÓN

Innovar y generar tecnología para producir alimento suficiente y de calidad para alimentar a la población mundial en rápido crecimiento de los tiempos modernos, siempre será el mayor desafío (Lira-Saldívar *et al.*, 2018). En los últimos años se ha reconocido el potencial de la nanotecnología (NT) con el uso nanomateriales en fertilizantes o nanopesticidas, en el manejo de nutrientes, mejora genética, tratamientos de enfermedades y como promotores de crecimiento en plantas (De la Rosa *et al.*, 2017).

La NT, es considerada como una tecnología, que se orienta al estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales a través del control de la materia a nano escala (Calle., 2010). A su vez la NT es un extenso campo de la investigación interdisciplinaria que en la actualidad está teniendo un gran auge, por medio de esta nueva tecnología pueden hacerse modificaciones en la composición del alimento, en el control de su maduración, en la estimación de vida útil, etc. En la industrialización de los alimentos es posible controlar el empaqueo y el control de calidad de los productos para extender su vida útil (Jaimes *et al.*, 2017). Servín *et al.*, (2015) mencionan que las técnicas nanotecnológicas son fundamentales para la producción de alimentos y la seguridad alimentaria a nivel mundial. En la actualidad la NT ha generado gran interés en el desarrollo de productos de uso agrícola como fertilizantes para aumentar el crecimiento y rendimiento de la planta, pesticidas para combatir plagas y enfermedades, sensores para monitorear la calidad del suelo y la sanidad de las plantas, como también el tratamiento de las aguas y la producción, elaboración, conservación y envasado de los alimentos (Fúnez *et al.*, 2016).

Es por eso que las inversiones en agricultura y alimentación nanotecnológica van en aumento, debido a que sus beneficios potenciales se

enfocan a mejorar la calidad e inocuidad de los insumos agrícolas al ser utilizados en menor volumen y promoviendo mejoras en la nutrición (Razzaq *et al.*, 2016).

La aparición de la NT y el desarrollo de nuevos nanodispositivos y nanomateriales abren nuevos potenciales para aplicaciones en la agricultura y la biotecnología. Las nanopartículas (NPs) son materiales de tamaño nanométrico, las cuales al ser utilizadas como agroquímicos podrían reducir el daño a los tejidos de la planta y disminuir la cantidad de productos químicos liberados en el medio ambiente (Srilatha, 2011). Las NPs metálicas han sido utilizadas en distintos estudios para analizar sus efectos fisiológicos que tienen sobre las plantas, así como su modo de acción a través de eventos bioquímicos que pueden llegar a modificar la expresión génica en las plantas, además de las posibles interacciones de estas con los patógenos del suelo (Peralta y Volke, 2012).

El pepino (*Cucumis sativus* L., familia cucurbitaceae) es una planta herbácea anual rastrera nativa de Asia y África, utilizada para la alimentación humana desde hace unos 3000 años, se cultiva mundialmente con varios propósitos: para consumo en fresco, industria del encurtido, e industria cosmética (Aguayo *et al.*, 2018). Es una hortaliza de alto impacto económico por ser un producto de exportación que se cultiva y se consume en muchas regiones del mundo (Leopoldo, 2015). En México la investigación científica sobre la utilización de NPs en la agricultura es poca e incipiente, estos materiales ofrecen incrementar la germinación y el crecimiento de las plantas, por ello el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de nanopartículas de óxido de zinc y nanopartículas de plata en la germinación de semillas de *Cucumis sativus* L. y asociar los cambios fisiológicos ocurridos a la inducción de estrés oxidativo por la aplicación de los tratamientos.

## **HIPÓTESIS**

La aplicación de nanopartículas de óxido de zinc y nanopartículas de plata estimularán la germinación y el vigor de semillas *Cucumis sativus L.*, mediante estrés oxidativo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto morfológico y bioquímico causado por la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc y nanopartículas plata a semillas de pepino (*Cucumis sativus L.*).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) como promotor del vigor y germinación en semillas de *Cucumis sativus L.*
- Evaluar el efecto de nanopartículas de plata (NPsAg) como promotor del vigor y germinación en semillas de *Cucumis sativus L.*
- Analizar los eventos bioquímicos asociados a estrés oxidativo debido a la aplicación de las nanopartículas metálicas durante la germinación de semillas *Cucumis sativus L.*

# 1.- REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1.- NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología (NT) es una nueva fuente emergente del campo de la ciencia, una partícula se define como un objeto pequeño que se comporta como una unidad completa con respecto a su transporte y propiedades (Capaldi *et al.*, 2015), “nano” es un prefijo griego que significa diminuto, enano, pequeño. Este prefijo se utiliza en el sistema internacional (SI) de unidades para indicar un factor de  $10^{-9}$  o una mil millonésima parte de algo. Por lo tanto, un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro (Corberth *et al.*, 2000), entre las disciplinas que convergen en ellas se encuentran la química, la física, la biología, la medicina y la ingeniería, entre otras (Mendoza-Urbe *et al.*, 2007) [Figura 1].

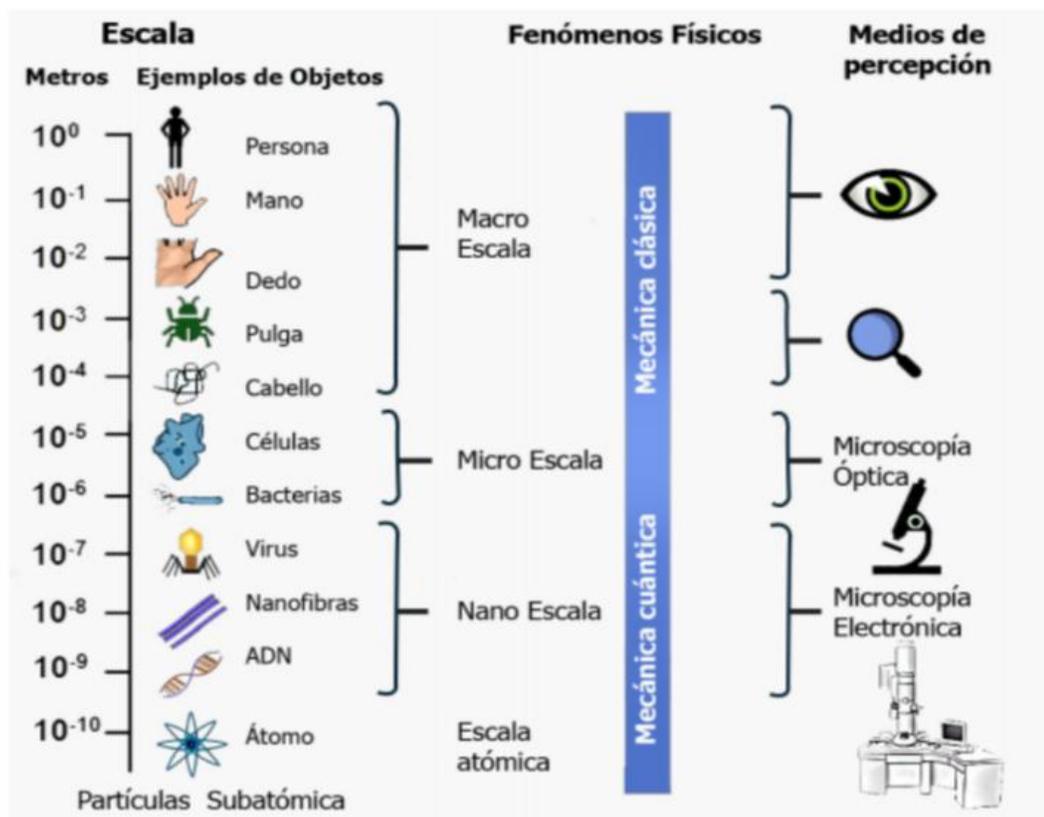


Figura 1 . Representación gráfica de la escala manométrica. Tomada de: Padilla-Vaca (2018).

Méndez-Argüello *et al.*, (2015) señala que la NT es una de las más relevantes innovaciones científicas, en muchos sentidos, la de mayor alcance en lo referente al alta tecnológica para la agricultura y los alimentos frescos. La NT consiste en el procesamiento atómico de los sistemas alimentarios, teniendo el potencial de coadyuvar a mantener sistemas de producción ecológicamente amigables, por lo que esta revolución diminuta se está haciendo presente poco a poco en la cotidianidad humana, ayudando a sentar las bases para el continuo desarrollo del campo mexicano.

Cabe destacar que tiene la capacidad de impulsar el incremento de la producción de alimentos por medio de la agricultura sustentable, debido a que permite usar agua, pesticidas y fertilizantes de forma más eficiente y en menor cantidad (Lira-Saldivar *et al.*, 2017). En el sector agroalimentario esta herramienta posibilita el desarrollo de productos y aplicaciones innovadoras: mejorar los colores, sabores y textura, aumentar la biodisponibilidad de nutrientes, evitar el deterioro microbiano de los alimentos envasados, etc. (De Ariño., 2018).

Las nanopartículas pueden clasificarse según su origen en: NPs de origen natural y NPs de ingeniería. Estas últimas pueden dividirse en 2 grupos: generadas de forma involuntaria y de forma deliberada, estas últimas producidas mediante las llamadas nanotecnologías (Santana Báez *et al.*, 2018). Las NPs pueden tener una mayor reactividad química y ser más bio-activas que las partículas más grandes, por su tamaño, tienen mejor acceso a cualquier cuerpo y tienen probabilidad de entrar en células, tejidos y órganos. Estas propiedades ofrecen nuevas aplicaciones en casi todas las áreas de la industria (Záyago y Foladori, 2010).

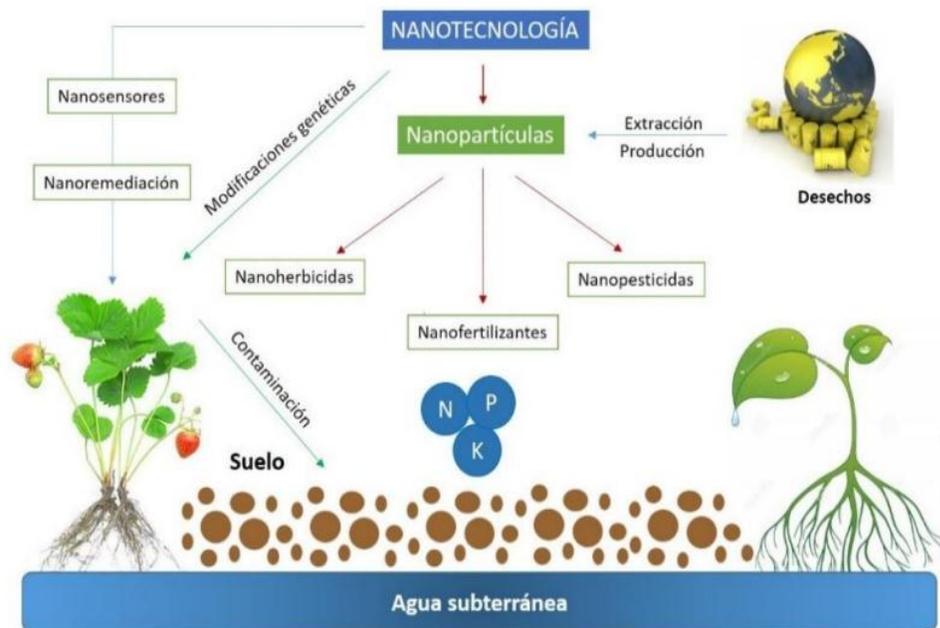
Nuñez *et al.*, (2018), reporta que debido al impacto que tiene la síntesis de materiales a nanoescala en el medio ambiente; en la actualidad, se están buscando nuevas alternativas para la obtención de las NPs, que sean más amigables con el

medio ambiente, proceso conocido como, síntesis verde o biosíntesis; la síntesis verde de NPs implica la utilización de sistemas biológicos como levaduras, hongos, bacterias o extractos de plantas. Aouada y De Moura (2015), señalan que, en los últimos años, el uso de la Nanotecnología ha aumentado ampliamente, puesto que varios materiales nanoestructurados o con dimensiones nanométricas se han utilizado como transporte en la liberación controlada de productos químicos debido a su degradación y baja toxicidad.

## **1.2.- LA NANOTECNOLOGÍA EN LA AGRICULTURA**

La agricultura, es la actividad básica por la cual los humanos viven y sobreviven en la tierra, es el sector más importante y estable, ya que produce y proporciona materia prima para la industria de alimento y de piensos. Unos de los propósitos del uso de la nanotecnología en la agricultura, es hacer frente a los problemas de este sector, llevando a cabo aplicaciones específicas de nanofertilizantes y nanoplaguicidas para aumentar la productividad del cultivo evitando la contaminación de suelos, aguas y ayudando en la protección contra diferentes plagas de insectos y enfermedades microbianas (Figura 2) (Prasad *et al.*, 2017). La aplicación de la NT en la agricultura son diversas, destacando principalmente la elaboración de pesticidas encapsulados para su liberación controlada, inhibición de microorganismos patógenos, control de enfermedades, transporte de fertilizantes, reguladores de crecimiento vegetal, liberación lenta de nutrientes, detección de microorganismos benéficos, e incremento de vida postcosecha, etc. (Medina-Pérez *et al.*, 2018).

En este sentido, se destaca el papel de las nanopartículas en la mejora de la seguridad del suelo, los diferentes efectos sobre las plantas y la importancia de estas nanopartículas para la nutrición de las plantas (Shalaby *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Aplicaciones potenciales de la nanotecnología en la agricultura, incluyendo la fabricación de nanosensores, nanofertilizantes, nanopesticidas y nanoherbicidas. Tomada de: (Lira-Saldívar et al., 2016).

Los diversos usos potenciales de la NT en la agricultura han creado un gran interés, ya que ofrecen la posibilidad de mejorar la producción agrícola mediante diversas estrategias que pueden incrementar la producción de alimentos utilizando menos insumos de energía y reduciendo los costos de producción y los desperdicios de agroquímicos (Servin y White., 2016). Es importante mencionar que el uso excesivo de pesticidas y otros productos químicos, ha provocado grandes problemas en el medio ambiente, como la contaminación, además de la formación de plagas y enfermedades resistentes a agroquímicos, así como la pérdida considerable de vegetación (Lira-Saldívar et al., 2014)

Los avances nanotecnológicos presentados en el sector agrícola se basan en fertilizantes nanoestructurados que pueden aumentar la eficiencia en el uso de nutrientes a través de mecanismos como la ejecución selectiva, lenta o de liberación controlada, liberando sus ingredientes activos en respuesta a su ambiente y demanda biológica. En recientes investigaciones a escala de laboratorio, se ha

informado que los nano-fertilizantes pueden mejorar la productividad de los cultivos mediante la mejora de la tasa de germinación de semillas, crecimiento de las plántulas, actividad fotosintética, el metabolismo del nitrógeno, de carbohidratos y la síntesis de proteína (Solanki *et al.*, 2015).

Existen productos nanotecnológicos que benefician la fotosíntesis, que esto con lleva a un mejor rendimiento del cultivo, sin embargo, no conocemos su impacto en los ecosistemas y no sabemos las consecuencias que puedan tener al ser asimilados por otros organismos vivos. Por lo que tenemos que ser precavidos al aplicar las nuevas tecnologías (Quispe-Challco., 2010).

Hoy día, el uso de la nanotecnología aplicada a la agricultura ha tenido una mayor relevancia que en años pasados. Anteriormente se señaló que los usos de las NPs en la agricultura buscan sustituir a muchos de los agroquímicos utilizados en estos momentos con el objetivo de reducir el impacto ambiental que esta actividad tiene, además de abaratar costos al ser necesaria una cantidad menor en comparación a las usadas actualmente (García-Rodríguez., 2018).

### **1.3.- NANOPARTICULAS METÁLICAS:**

Las nanopartículas han surgido como una plataforma versátil, que podría proporcionar soluciones científicas y ambientales aceptables para el sustento global estas tienen un alto potencial para lograr una agricultura sostenible (Shalaby *et al.*, 2016). Las NPs metálicas, más representan su grupo son las nanopartículas de óxido de Zinc (NPsZnO), de óxido de cobre (CuO) y las de plata (NPsAg) debido a que muestran propiedades antimicrobianas y se han utilizado en diversas áreas incluyendo la alimentación animal, industria textil y el tratamiento de aguas (Alvarado *et al.*, 2014), el uso de nanopartículas en la industria, la salud y las áreas de higiene personal está aumentando de manera exponencial debido a sus

propiedades mecánicas, electrónicas y químicas que estas poseen (Somasundaran *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que en el sector agrícola los reportes sobre la aplicación de nanopartículas (NPs) metálicas de Fe, Cu y Zn, indican que mejoran la germinación de las semillas, el crecimiento, el contenido nutricional, la actividad enzimática y rendimiento (Lira-Saldívar *et al.*, 2018). Se ha reportado que el uso de nanopartículas de este tipo, incrementa la producción de biomasa en plantas hasta en un 100%, aumenta los niveles de clorofila, carotenoides y proteínas solubles totales (Venkatachalam *et al.*, 2017).

#### **1.4.-ABSORCIÓN, TRANSLOCACIÓN Y EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA PLANTA.**

El tamaño de las NPs es un factor que interviene en su penetración y translocación hacia el interior de los tejidos vegetales, por lo tanto, a mayor tamaño de NPs menor será la penetración en las plantas (Lira-Saldívar *et al.*, 2018), su tamaño nanométrico les da mayor facilidad de penetración a través de las membranas biológicas, en comparación con los materiales con escala micrométrica; en las plantas tiene mayor facilidad de penetrar la membrana y pared celular causando cambios morfo-fisiológicos (Eichert *et al.*, 2008; Sabir *et al.*, 2014).

Algunos autores mencionan que el efecto promotor e inhibidor del crecimiento de las NPs en las plantas está relacionado con su concentración, tamaño y las propiedades inertes del elemento involucrado, así como la función fisiológica que desempeña en la planta, si actúa como micronutrientes tratándose de cobre, zinc o hierro (Wang *et al.*, 2015). Las paredes celulares de la mayoría de las plantas poseen tamaños de poro de 5 nm o menos. Sin embargo, se ha demostrado que las NPs tienen un tamaño entre 10-50 nm y con diferentes propiedades químicas superficial son biodisponibles las plantas (Sarabia y Fernández, 2016).

Cuando las NPs se administran a las plantas mediante el sistema de riego, primero penetran la pared y membrana celular de la epidermis de la raíz (Miralles *et al.*, 2012). Durante el tránsito de las NPs por los caminos del apoplasto y simplasto sucede una serie de eventos, que finalmente logran ingresar al haz vascular de la planta (xilema), para ser traslocadas por un largo camino hasta el destino final que son los puntos de crecimiento (meristemas), hojas y frutos, lugares donde serán empleadas para originar diversos efectos morfológicos y fisiológicos (Ma *et al.*, 2017).

Por otro lado, cuando las NPs son aplicadas al follaje se absorben a través de los estomas y su translocación o transporte es vía floema. Raliya *et al.*, (2016) mencionan que las NPs de Au con tamaños de 30-80 nm aplicadas foliarmente, lograron penetrar los estomas de plantas de sandía (*Citrullus lanatus*) y fueron traslocadas hasta las raíces vía floema. Estos autores concluyen que la acumulación y transporte de las NPs depende de su forma, método de aplicación y naturaleza del tejido de la planta.

## **1.5.-NANOPARTÍCULAS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO**

El efecto promotor o inhibidor del crecimiento de las NPs en las plantas está relacionado con su concentración, tamaño y las propiedades inherentes del elemento involucrado y si actúa como micronutriente tratándose de cobre, zinc, etc. (Lira-Saldívar *et al.*, 2016).

### **1.5.1.-NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC**

El óxido de zinc (ZnO) es un material semiconductor que ha sido ampliamente utilizado como catalizador, dispositivo de electro-luminiscencia y fotoluminiscencia, sensor de gas, material farmacéutico, recubrimiento antirreflejo, electrodo transparente para células solares, protector UV entre otros (Guerrero *et al.*, 2013). Mendez-Arguello *et al.*, (2016) menciona que las NPsZnO han recibido especial importancia en la industria de los cosméticos, textiles, medicina, electrónica y en la

producción de alimentos. Por otro lado, las NPsZnO han sido aplicadas en revestimientos de latas de comidas y empaques de productos cárnicos así como en aplicaciones en la industria médica, farmacéutica y cosmética (Alvarado *et al.*, 2014).

Por lo que respecta al sector agrícola las NPsZnO son estudiadas por su actividad antimicrobiana, por su potencial como nanofertilizantes y promotores de crecimiento (Méndez-Argüello, *et al.*, 2015). En la tabla 1 se mencionan algunos efectos que pueden tener las NPsZnO.

Flores-Ramírez (2018) reporta que la aplicación de NPs de ZnO a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  durante la imbibición, en semilla de melón (*Cucumis melo*) de la variedad Top-Mark, mejoró el porcentaje de vigor de germinación, el porcentaje de germinación, e incrementó la longitud de vástago, con respecto al testigo. Delouche (2002), señala que diversas investigaciones mencionan que las NPs se absorben fácilmente durante la etapa de imbibición en el proceso de germinación de las semillas. Sin embargo, se sabe que a altas concentraciones pueden tener un efecto adverso así lo comprobó Arias y colaboradores (2015) quienes al aplicar NPsZnO a una concentración de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  a semillas de girasol, el porcentaje de germinación fue de 94.44 %, mientras que el porcentaje obtenido en semillas tratadas con  $1600 \text{ mg L}^{-1}$  fue del 74.44 %, en base a los resultados, se considera que a altas concentración el efecto en el crecimiento resultante es negativo y afecta considerablemente la germinación de la semilla.

**Tabla 1** Efectos fisiológicos de nanopartículas de ZnO en diferentes especies de plantas.

<b>NPs</b>	<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Planta</b>	<b>Efecto fisiológico</b>	<b>Referencia</b>
ZnO	200, 400, 800	<i>Allium cepa</i>	Citotoxicidad en células de la raíz. Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y glutatión peroxidasa, mientras que una disminución en catalasa.	Ghosh <i>et al.</i> , 2017
ZnO	25-200 mg L <sup>-1</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i> L	Registraron un aumento en el crecimiento y biomasa total, como también mostraron aumento en clorofila a y contenido total de proteínas	Venkatachalam <i>et al.</i> , 2017
ZnO	8.1, 16.3	<i>Triticum aestivum</i>	Reduce la eficiencia fotosintética. Aumento de peróxido de hidrogeno y peroxidación lipídica. Inhibición de la actividad antioxidante.	Tripathi <i>et al.</i> , 2017
ZnO	10	<i>Pennisetum americanum</i>	Aumento en producción de biomasa seca. Longitud de raíz, contenido de clorofila y rendimiento de grano.	Tarafdar <i>et al.</i> , 2014
ZnO	10, 20	<i>Allium cepa</i>	Mejora la germinación de semillas de cebolla.	Ramesh <i>et al.</i> , 2014
ZnO	1.5, 10	<i>Cicer arietinum</i>	Mayor altura y biomasa seca.	Burman <i>et al.</i> , 2013
ZnO	250, 500, 1000, 2000	<i>Triticum aestivum</i>	Promueve incrementos clorofila y proteína en plántulas.	Raliya y Tarafdar, 2013
ZnO	10	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	Mayor producción de biomasa, contenido de clorofila, longitud y área radicular.	Raliya y tarafdar, 2013
ZnO	400, 1000, 2000	<i>Arachis hypogaea</i>	1000 mg L <sup>-1</sup> promovió la germinación de semilla y el vigor, mientras que 2000 mg L <sup>-1</sup> se observó que era tóxico para la planta.	Prasad <i>et al.</i> , 2012

ZnO	1000	<i>Arachis hypogaea</i>	Promueve germinación, así como la elongación de raíz y tallo.	Prasad <i>et al</i> 2012
ZnO	20	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mayor crecimiento y producción de biomasa	Panwar, 2012
ZnO	10, 20, 50, 100, 200, 1000	<i>Lolium perenne</i>	Por encima de 20 mg L <sup>-1</sup> , se observó una disminución en la biomasa de plántulas.	Lin y Xing, 2008

### 1.5.2.- NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Desde la antigüedad la plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada, es así que civilizaciones antiguas como los griegos la empleaban para cocinar, preservar el agua e inclusive como antimicrobiana en medicina tradicional (Devaraj *et al.*, 2013). En efecto la plata es un metal blanco, brillante, suave y maleable con unos de los valores más altos de conductividad térmica y eléctrica; desde el punto de vista químico es considerado como un metal precioso (Fages, 2012).

Las NPsAg (Ag) son las que poseen mayor actividad antimicrobianas de espectro más amplio en comparación con su contraparte a granel (Ivask *et al.*, 2014). Actualmente se utilizan para la desinfección del agua potable, el tratamiento de aguas residuales (Ahmed *et al.*, 2014; Lalley *et al.*, 2014; Loo *et al.*, 2015), conservación de alimentos (Llorens *et al.*, 2012), usos médicos / clínicos (Ge *et al.*, 2014), y en numerosos productos de consumo (Wen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) por su fácil degradación.

Por lo que respecta al sector agroalimentario las NPsAg también tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las NPsAg se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan a su vez un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos, además pueden ser empleadas en la fabricación de materiales en contacto con los alimentos, eliminando hasta en un 90 % el crecimiento de microorganismos en los alimentos, siendo una alternativa a otros métodos de conservación de alimentos (Nuñez y colaboradores, 2018).

Por otra parte, el efecto de las NPsAg se basa en el aumento de la relación área/volumen del metal del tamaño nanométrico (Juan *et al.*, 2014). Las NPsAg han sido empleadas por sus propiedades bactericidas y ópticas, convirtiéndose agentes antimicrobianos y antivirales. En general la obtención de NPsAg se realiza a través de métodos físicos, químicos y biológicos (Amaguaña Pacheco., 2018).

En las plantas las NPsAg se pueden absorber principalmente a través de la raíz y luego pueden ser transportadas a las hojas (Dietz y Herth, 2011). Se ha sugerido que estas pueden agregarse en plasmodesmos y en la pared celular, lo que puede interferir con la comunicación intercelular, afectando la función de proteínas de transporte (Geisler-Lee *et al.*, 2014).

Estudios de toxicidad en plantas por NPsAg coinciden en su toxicidad es dependiente de la concentración, del tamaño, y del tiempo de exposición (Zuverza-Mena *et al.*, 2017). Su fitotoxicidad se ha relacionado con la captación de las NPsAg por las plantas y la presencia de iones  $Ag^+$  disueltos. Sin embargo, el efecto fitotóxico no solo puede deberse a lo antes mencionado. Se ha reportado que cuando las raíces de las plantas están expuestas a estas, presentan alteraciones en la morfología celular y un cambio notable en el color en la zona apical de la raíz atribuida a la producción de metabolitos secundarios producidos por las raíces (Ma *et al.*, 2010a, Geisler-Lee *et al.*, 2014b).

Diversos estudios han reportado que las nanopartículas tienen efectos tanto positivos como negativos en el crecimiento y desarrollo de varias especies de plantas. Se ha demostrado que las NPsAg activan al ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) el cual es un inhibidor de la elongación de la raíz (Syu *et al.*, 2014). Los cambios fisiológicos y moleculares de la exposición a NPsAg se investigaron en las plántulas de arroz (*Oryza sativa L.*) donde se observó que causaban una reducción significativa en el alargamiento de la raíz, peso fresco de brotes y raíces, contenido total de clorofila y carotenoides conforme se incrementaba la concentración, la exposición prolongada a las NPsAg resultó en un aumento dependiente de la dosis en el incremento de generación de especies reactivas de oxígeno que a su vez causaron citotoxicidad (Nair y Chung, 2014).

Algunos estudios consignan que las NPsAg mejoran el crecimiento de las plantas, incrementan la longitud de la raíz, el área foliar y atributos bioquímicos, como clorofila, carbohidratos y proteínas, activando su sistema enzimático antioxidante (Sharma *et al.*, 2012, Salama, 2012). Además, de mejorar el crecimiento de las plantas, es capaz de inducir la producción de metabolitos secundarios de interés como lo es la diosgenina (Jasim *et al.*, 2017), o de metabolitos involucrados con la modulación antioxidante como el ácido ascórbico el cual se vio incrementado en espárragos expuestos a NPsAg (An *et al.*, 2008). En la tabla 2 se muestra que la exposición de NPsAg puede tener muchos efectos fisiológicos y consecuencias bioquímicas en las plantas (transpiración, estrés oxidativo y genotoxicidad, entre otros). Este escenario requiere un enfoque integral desde el nivel fisiológico y bioquímico hasta el nivel molecular para obtener información detallada sobre el impacto de los NPsAg y poder dilucidar su efecto sobre los sistemas vegetales. Una de las consecuencias de la exposición a NPsAg es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que puede causar toxicidad. Sin embargo, la producción de ERO y los mecanismos de eliminación antioxidantes asociados desempeñar un papel clave en el impacto de las NPsAg en las plantas.

**Tabla 2.** Efectos fisiológicos de nanopartículas de Ag en diferentes especies de plantas.

<b>NPs</b>	<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Planta</b>	<b>Efecto fisiológico</b>	<b>Referencia</b>
Ag	0,5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Inhibición significativa el crecimiento de las plantas y la síntesis de clorofila.	Li Xingxing <i>et al.</i> , 2018
Ag	0.2 mg/planta	<i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	Aumento el crecimiento, numero de hojas, longitud de raíz, longitud del brote y el peso húmedo.	Jasmin B <i>et al.</i> , 2017
Ag	0, 125, 250, 500	<i>Raphanus sativus</i>	Ninguna de las concentraciones redujo la germinación de las semillas.	Zuverza-Mena <i>et al.</i> , 2016.
Ag	1500	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Inhibición más pronunciada	Sosan-A <i>et al.</i> , 2016.
Ag	0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2	<i>Zea mays L.</i> <i>Cucurbita pepo L.</i> <i>Citrullus lanatus</i>	mostraron efecto tóxico en la raíz de maíz. Valores porcentuales en germinación en plantas de sandía y calabacín. El crecimiento de las plantas fueron positivas en sandía y calabacín.	Almutairi <i>et al.</i> , 2015.
Ag	1000 μM, 3000μM	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mayor crecimiento y producción de biomasa	Panwar, 2012

## 1.6.- ESTRÉS OXIDATIVO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

A medida que las semillas envejecen, su capacidad para germinar disminuye incluso si se almacenan en condiciones óptimas. Esta pérdida de potencial de producción es un obstáculo para la producción agrícola y para la conservación de germoplasma y especies. Comprender cómo ocurre esto y prevenir o disminuir potencialmente la pérdida de vigor de la semilla es de gran interés para los investigadores de plantas.

Los nanomateriales pueden provocar alteración en la fisiología, toxicidad e interferir en el metabolismo de las plantas a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las plantas continuamente producen ERO en diferentes organelos celulares como: mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, retículo endoplásmico y en la membrana plasmática. Las ERO son continuamente removidas por un complejo sistema antioxidante, en el que participan enzimas y otros metabolitos (Lira-Saldívar *et al.*, 2016). Las ERO funcionan como mensajeros celulares, trabajando como reguladores redox en una multitud de procesos biológicos (Ortega-Villasante *et al.*, 2018). Sin embargo, a altas concentraciones, producen efectos tóxicos que conducen al llamado "estrés oxidativo", una condición que interrumpe la señalización y el control redox-en consecuencia, las células vegetales tienen que ser al menos dos mecanismos de eliminación de ERO, el primero controla la modulación fina de su concentración para fines de señalización y el segundo para eliminar los niveles de alta concentración de ERO (Doménech-Carbó *et al.*, 2019). Las ERO interactúan con las biomoléculas y, por lo tanto, dificultan el proceso de crecimiento y diferenciación, así como afectan el metabolismo secundario. Para neutralizar los efectos adversos de estos, las células vegetales utilizan enzimas endógenas como POD y SOD, o provocan un sistema no enzimático para liberar polifenoles (Fazal, H *et al.*, 2019).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se han convertido en las principales moléculas reguladoras en las plantas y ahora se establece su papel en los primeros eventos de señalización iniciados por la perturbación metabólica celular y los

estímulos ambientales (Waszczak, C *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios recientes han revelado que también están involucrados en numerosos procesos a lo largo del ciclo de vida de la planta, desde el desarrollo y germinación de las semillas, hasta el desarrollo de raíces, brotes y flores (Mhamdi, A *et al.*, 2018). Cabe mencionar, como las moléculas tóxicas, las ERO también son capaces de causar lesiones celulares o la muerte (Miller, G *et al.*, 2018).

Dentro de los antioxidantes enzimáticos tenemos diferentes enzimas como:

I) La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso. El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos y tiene entre otras una función protectora contra microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos. Esta función la efectúa esta enzima que cataliza su descomposición en agua y oxígeno (Chance *et al.*, 1997). CAT son enzimas indispensables para la desintoxicación de las ERO durante condiciones de estrés (Garg y Manchanda, 2009), fue una de las primeras enzimas en ser aislada y obtenida con un alto grado de pureza (Balestrasse *et al.* 2001).

II) La ascorbato peroxidasa (APX) se cree que juega el papel más esencial en la eliminación las ERO y protegiendo a la célula en plantas superiores, algas y otros organismos. El APX está involucrada en la compactación de  $H_2O_2$  en ciclos de agua-agua y ciclo ascorbato-glutación (ASH-GSH) y utiliza ascorbato reducido (ASH) como el donador de electrones. Glutación reductasa (GR) es una enzima potencial del ciclo ascorbato-glutación (ASH-GSH) y desempeña un papel esencial en el sistema de defensa contra las ERO (Gill y Tuteja, 2010; Ahmad *et al.* 2010).

## 1.7.- IMPORTANCIA DEL PEPINILLO EN MÉXICO

El cultivo del pepino (*Cucumis sativus. L*) pertenece al reino vegetal su división es Embryophyta siphonogama (fanerógamas) así como su subdivisión Angiospermae. El pepino tiene clase dicotiledoneae y su orden es Cucurbitaceae. Como ya se sabe el pepino es del género *Cucumis* y tiene como especie sativus es por eso que su nombre científico es *Cucumis sativus. L* (Moroto., 2002). La especie se encuentra dentro de las hortalizas de mayor importancia dado su consumo per cápita como hortaliza de mesa (FAO, 2012). Se utiliza actualmente para consumo en fresco, también para obtención de aceites de las semillas y su uso en productos de belleza (jabones, cremas corporales) gracias a su riqueza en agua, vitamina E y aceites naturales (SIAP., 2012). En México, es un cultivo importante por el consumo, producción y su valor nutrimental (Waris *et al.*, 2014). La buena calidad de los frutos de pepino esta principalmente representada en su forma, firmeza, color verde oscuro del exocarpo, tamaño y ausencia de defectos de crecimiento o manejo (Suslov y Cantwell., 2012).

En México es un cultivo altamente rentable ocupando el segundo lugar en importancia entre las hortalizas exportadas y el primer proveedor del mercado de Estados Unidos, principalmente en la época de invierno, cuando se produce esta hortaliza en invernaderos y se aumenta significativamente el rendimiento (Intagri 2012). El cultivo de pepino ha ido en aumento en las últimas décadas dado que es un producto que es consumido en muchas regiones del mundo. Se desarrolla en el periodo primavera-verano cuando la demanda evaporativa es alta. (FAO., 2006). El cultivo de esta hortaliza tiene una estabilidad de la superficie, con un aumento de la producción y exportación (León Moreta., 2016).

Esta hortaliza ha alcanzado gran importancia a la gran diversidad de climas y la adaptabilidad que presenta, ya que esta hortaliza se cultiva en 29 Estados de México (SAGARPA, 2010).

## **2.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO**

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Agrobiotecnología del departamento de Biociencias y Agrotecnología en el Centro de Investigación en Química Aplicada durante el periodo enero-mayo 2018.

### **2.2 MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal utilizado fueron plántulas de *Cucumis sativus L.* establecidas en el Laboratorio de Agrobiotecnología del Centro de Investigación en Química Aplicada.

### **2.3.- PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO Y Ag**

Se prepararon suspensiones acuosas con las diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsAg, utilizando agua desionizada estéril como solvente y alcohol tridecílico polioxietilenado+ nonil fenol polioxietilenado + propilenglicol (bionex<sup>®</sup>), como agente dispersante de las NPs. Para alcanzar un mayor grado de homogeneidad de las nanopartículas en la suspensión, se sometieron a un proceso de sonicación de baño (*Branson 2510*) por un intervalo de tiempo de 10 a 15 min. Las concentraciones que se evaluaron fue de un rango entre 0 y 200 mg L<sup>-1</sup> (0, 50, 100, 200 mg L<sup>-1</sup>) para ambos nanomateriales.

### **2.4 PRUEBA DE GERMINACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NPsAg Y NPsZnO**

#### **2.4.1 CURVA DE IMBIBICIÓN**

Para llevar a cabo la determinación de las concentraciones óptimas en las cuales ambos nanomateriales mostrarán un efecto como promotores de germinación e incremento del vigor de semillas, se siguieron los parámetros de la técnica de germinación estándar de semillas en papel ancore, propuesta por la Asociación Internacional de Evaluación de Semillas (ISTA, 2014) -ISTA por sus

siglas en inglés. Esta técnica de evaluación de semillas se basa en la comparación de una expresión morfológica diferencial entre plántulas dentro de un periodo de tiempo definido, dicha diferencia es atribuible al vigor de cada semilla, mismo que se utiliza como criterio de referencia sobre la calidad de lotes o tratamientos evaluados (ISTA, 2014).

Como primer requisito para implementar esta metodología, es necesario estimar el tiempo de imbibición de la semilla de *Cucumis sativus L.*, ya que éste varía dependiendo de la especie y otro rasgo importante de este proceso, radica en que la diferencia entre potenciales osmóticos característicos de esta fase será el mecanismo de entrada de los NMs de interés (NPsZnO y NPsAg hacia los tejidos seminales).

Para establecer la duración de la fase de imbibición, se realizó una curva de germinación, con el fin de determinar el número máximo de horas que se debe tratar las semillas para que estas embeban las diferentes suspensiones de NPs, a través de la testa. Esta curva se caracteriza por tener 3 fases: Hidratación enzimática, Imbibición y Emergencia de radícula; siendo la segunda de éstas, la de interés para el bioensayo citado. Para realizarla se consideraron 25 semillas de *Cucumis sativus L.* por unidad experimental (caja Petri) con cuatro repeticiones.

Primero se registró la masa (g) inicial de las 25 semillas sin hidratar, después se colocaron en cada una de las cajas Petri de vidrio (100 x 15 mm) y se les agregó un volumen de 15 mL de agua destilada; posteriormente, se generó un registro de la ganancia de peso por unidad de tiempo (h) y como resultado fue posible detectar el punto en el cual las semillas cesaron el proceso de absorción de agua, al inferirse tras la permanencia constante de la masa del grupo evaluado. Esto ocurrió al transcurrir un periodo de 36 h.

#### **2.4.2 GERMINACIÓN ESTÁNDAR**

Las semillas de *Cucumis sativus L.* se imbibieron con las suspensiones de NPsZnO y NPsAg por 13 h, las semillas se germinaron entre dos bases de papel Anchor previamente humedecido con agua destilada, posteriormente las semillas se organizaron en hileras respetando un margen superior de 6 cm, dejando un espacio de 2.5 en los costados y una distancia entre semillas de 0.5 cm, se cubrieron las semillas con otra hoja de papel Anchor humedecido con agua destilada, las hojas fueron enrolladas en forma de “taco”, procurando darle un ancho de 5 cm, al finalizar los “tacos” fueron acomodadas aleatoriamente dentro de bolsas de polietileno transparente que fueron colocadas dentro de una canasta de plástico profunda (cada “taco” se consideró como una unidad experimental, la cual fue rotulada) bajo condiciones controladas de temperatura en una cámara de crecimiento (*Equitec*) a  $25 \pm 2$  °C y fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad. El bioensayo consistió en 4 tratamientos y 5 repeticiones.

Se establecieron 2 momentos puntuales de evaluación, se realizó un primer conteo a los 7 días después de haber realizado la siembra y la segunda evaluación fue a los 14 días. En la primer evaluación se determinó el número de plántulas normales (plántulas con raíz y tallo, cada estructura con al menos dos veces del tamaño de la semilla en longitud), como un indicador de vigor de germinación de las semillas, dentro de los parámetros estipulados en la metodología (ISTA, 2014); como lo es, la presencia de todas las estructuras morfológicas características de una plántula dicotiledónea hasta ese momento en particular, es decir, por parte del sistema radicular: una raíz primaria bien formada y de mayor tamaño que las raíces secundarias, gravitropismo definido, inicio del desarrollo de las raíces secundarias.

Para la segunda evaluación, se obtuvo el número de plántulas normales (PN) y también de aquellas con un desarrollo anormal (PA) y las semillas sin germinar (pérdida de dominancia apical radicular, coloración atípica o clorosis, o bien, malformación de tejidos (hipo o hiperplasias), daño cotiledonear >50%, enanismo, etc. Tras la culminación de las dos evaluaciones mencionadas, los datos

obtenidos se sometieron a la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de germinación (% G; Ecuación 1; Moukrad *et al.* 2014).

Ecuación 1:

$$\% G = \frac{SG \times 100}{TS}$$

Donde:

% G = Porcentaje de germinación.

SG = Número de semillas germinadas.

TS = Número de semillas totales.

Para complementar esta información, se integraron los datos obtenidos de las variables:

- Vigor de las semillas (VG; expresada en %).
- Longitud de plúmula (LP; expresada en mm).
- Longitud de radícula (LR; expresada en mm).
- Contenido de biomasa (CB; expresada en mg).

Para la determinación del vigor de las semillas de pepinillo, se realizó el conteo de las plántulas que cumplieron con los criterios mencionados en cuanto a la morfología “normal” característica de la especie para los periodos establecidos. Posteriormente los datos obtenidos se procesaron para denotar su representación relativa mediante la ecuación 2 (ISTA, 2014).

Ecuación 2:

$$V = \frac{PN \times 100}{TS}$$

Donde:

V = Vigor (%).

PN = Número de plántulas normales.

TS = Total de semillas.

Para determinar la LP y la LR se utilizó una cinta métrica. En cuanto al contenido de biomasa, se realizó partiendo de la separación de los órganos de cada planta según su función, clasificándose en: plúmula (hojas cotiledoneas y tallo) y sistema radicular. Tras realizar la mencionada separación, se determinó la masa (mg), registrando la cifra resultante como peso fresco de muestra (PF); posteriormente, las muestras se introdujeron en una estufa de secado, sometiénolas a una temperatura de 72 °C por 24 h; transcurrido este periodo, se procedió con el registro de la masa de las muestras correspondiente al peso seco de la muestra (PS). Para este ensayo se tomaron 5 plántulas de cada “taco”, es decir de cada repetición, siendo designadas de manera aleatoria.

## **2.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS SOBRE EL ESTADO DE ESTRÉS OXIDATIVO.**

El método de selección del material vegetal que conformaría cada muestra para la determinación del contenido cuantitativo de la actividad de las enzimas antioxidantes, prolina y clorofila, se basó en un criterio aleatorio apegado al diseño experimental con 4 repeticiones; la cantidad de tejido a extraer por muestra fue de 500 mg. Como método de conservación de las muestras para evitar alteraciones de los estados bioquímicos y fisiológicos de los tejidos, se empleó su congelamiento instantáneo mediante su inmersión en nitrógeno líquido. El almacenamiento de las muestras se llevó a cabo a -80 °C hasta el momento de su uso.

## **2.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA.**

### **2.6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROLINA.**

Se realizó con apego a lo publicado por Ábrahám *et al.* (2010). A cada muestra de 500 mg de tejido, triturada con nitrógeno líquido y contenida en un tubo de ensayo, le fue agregada una solución al 3 % de ácido salicílico frío, para centrifugarse a una velocidad de 14000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante; del cual se tomaron 100 µL para preparar la mezcla de reacción (600 µL), que consistió además en agregar ácido sulfosalicílico (0.43%), ácido acético glacial (28.6% v/v) y ninhidrina acidificada (ácido fosfórico 6M y ácido acético) en la misma proporción volumétrica que el ácido acético glacial; una vez agregada la ninhidrina la mezcla fue incubada a 96 °C por 1 h.

Transcurrido dicho periodo, la reacción se terminó, generando un choque térmico, transfiriendo los tubos contenedores a una temperatura de 4°C. Una vez que las muestras alcanzaron una temperatura constante, se les agregó 1 mL de tolueno para hacer la separación de la fase orgánica, después de agitarse vigorosamente, se dejaron en reposo por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente fue estimada su absorbancia a 520 nm. Para obtener la cantidad de prolina (µg) presente por cada gramo de tejido de *Cucumis sativus L*, los registros de absorbancia fueron incorporados al modelo obtenido de la curva estándar generada a partir de diferentes concentraciones de prolina (0.019, 0.039, 0.059, 0.079, 0.099 µmol L<sup>-1</sup>) (Anexo 2).

### 2.6.2 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A Y B.

El contenido de clorofila se realizó por el método descrito por Sunkar (2010). Dónde a partir de 100 mg de tejido foliar congelado, triturado y suspendido en etanol al 80%, se generó una alícuota, tras ser centrifugado a 10,000 rpm por 15 min. Al ser un pigmento fotosensible, fue conservado en condiciones de oscuridad hasta ser estimada su absorbancia utilizando un espectrofotómetro (*Genesys 10 uv*), a una longitud de onda para la clorofila A de 645 nm y para la de clorofila B, de 663 nm.

El contenido total de clorofila se determinó con las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila A} = [(12.7 * \text{Absorbancia a } 663\text{nm}) - (2.63 * \text{Absorbancia a } 645 \text{ nm})] \\ * \left( \frac{V}{1000 * w} \right)$$

$$\text{Clorofila B} = [(22.9 * \text{Absorbancia a } 645 \text{ nm}) - (4.68 * \text{Absorbancia a } 663 \text{ nm})] \\ * \left( \frac{V}{1000 * w} \right)$$

*Clorofila Total*

$$= [(20.2 * \text{Absorbancia a } 645 \text{ nm}) + (8.02 * \text{Absorbancia a } 663 \text{ nm})] \\ * \left( \frac{V}{1000 * w} \right)$$

Donde:

*Absorbancia* (663) = Absorbancia a 663 nm.

*Absorbancia* (645) = Absorbancia a 645 nm.

V = Volumen final de la solución (mL).

w = Peso fresco de la hoja (g).

## **2.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD.**

Para llevar las unidades volumétricas de la actividad enzimática a unidades de actividad específica, se realizó esta prueba, donde se preparó un volumen de reacción de 2 mL; con 50 µL de extracto enzimático, 950 µL de H<sub>2</sub>O y 1000 µL reactivo de Bradford (Bio rad), se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro (*Genesys 10 uv*) a 595nm (Kruger, 2009). De cada tratamiento se consideraron 3 repeticiones y cada muestra se procesó por triplicado. Para la obtención del contenido de proteína por muestra, se hizo una curva estándar con diferentes concentraciones de BSA, de la cual se obtuvo el modelo ( $y = 0.026 x + 0.3122$  -Anexo 1- ) donde se introdujeron los valores obtenidos de absorbancia como variable dependiente.

## **2.8 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE.**

### **2.8.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.**

Para realizar la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes, APX y CAT, se realizó un extracto enzimático de acuerdo a la metodología reportada por Katoch (2011), la cual nos permite evaluar todas las enzimas antes mencionadas con el mismo extracto, para ello, se tomaron de 500 mg de tejido, el cual fue triturado en un mortero pre-enfriado con nitrógeno líquido y se le adicionó polivinilpirrolidona (PVP); el producto resultante fue colectado en un tubo de microcentrífuga (2 mL), al

cual fue añadido amortiguador de extracción que consistió en un amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7 y EDTA (0.1 mM). Posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 12,000 rpm. Transcurrido dicho periodo, el sobrenadante fue vertido en tubos de microcentrífuga nuevos y congelados a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **2.8.2 ACTIVIDAD DE ASCORBATO PEROXIDASAS**

La actividad de APX se cuantificó por el método descrito por Katoch, (2011), la mezcla de reacción se consideró para un volumen de 1 mL el cual consistió en 50 mM de solución amortiguadora de fosfatos pH 7, una proporción 1:1 de ácido ascórbico: peróxido de hidrógeno (10 mM), extracto enzimático (3% v/v). La reacción se inició con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se registró la absorbancia a 290 nm cada 20 seg por 1 min ( $\epsilon = 2.211 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad se expresará como la cantidad de proteína que produce un mmol de ascorbato oxidado por minuto.

### **2.8.3 ACTIVIDAD DE CATALASAS (CAT).**

La mezcla de reacción consistió en 50 mM de solución amortiguadora de fosfatos pH 7, peróxido de hidrógeno (0.5 M) y la cantidad necesaria de proteína dependiendo la muestra en un volumen de 1 ml (5% v/v). La reacción se inició con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se registró la absorbancia a 240 nm cada 20 seg por 1 min ( $\epsilon = 2.640 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Expresando la actividad de estas enzimas como mmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradados por minuto por gramo de proteína contenido en el tejido. (Katoch, 2011).

### **2.8.4. ZIMOGRAMAS EN GELES NATIVOS**

Para observar el perfil de isoenzimas presentes en los extractos crudos se realizaron geles de poliacrilamida 7 y 10% como lo describe Laemmli, (1970), sin SDS; se aplicaron 60 µg de proteína en cada pozo.

#### **2.8.4.1 CATALASA**

Se utilizó un gel nativo de poliacrilamida al 5 % al que se aplicaron los extractos a evaluar y se corrieron a 90V. El gel se sumergió en una solución de 50

mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 10 min, seguido por un enjuague con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0. Posteriormente el gel fue sumergido durante 10 min en una solución que contenía 2 %  $\text{FeCl}_2$ , esta solución fue eliminada por decantación y se prosiguió a sumergirlo en una solución de 2%  $\text{K}_3\text{FeCN}_6$  hasta observar las bandas acromáticas presentes en el gel (Woodbury, 1971).

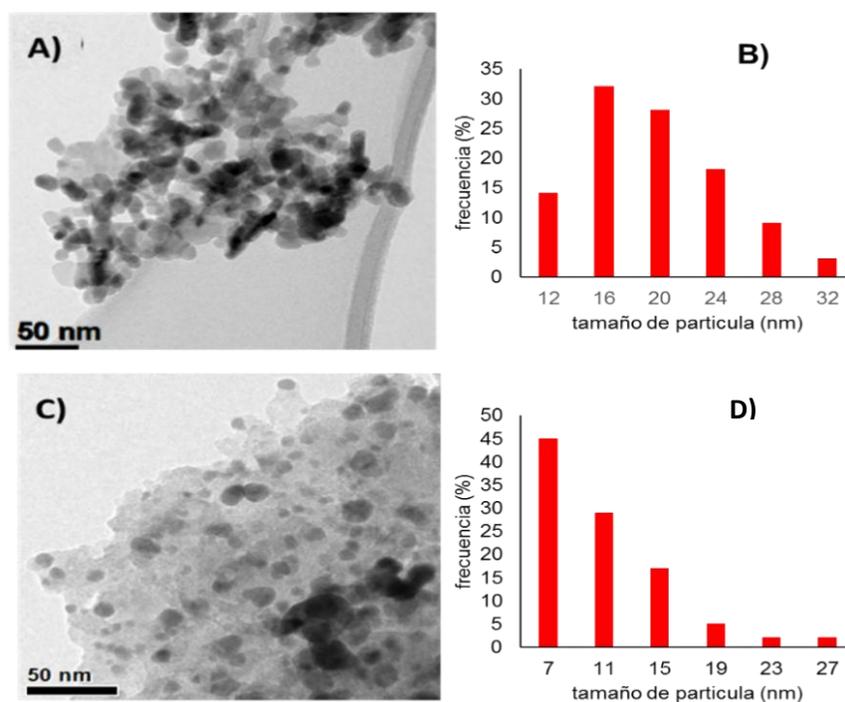
#### **2.8.4.2 GUAYACOL PEROXIDASA**

Se utilizó la metodología reportada para la cuantificación de peroxidasa según Pütter (1971). Se utilizó un gel nativo de poliacrilamida al 7% al que se aplicaron 60  $\mu\text{g}$  de proteína que se corrieron a 90 V. El gel se sumergió en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y solución amortiguadora de fosfatos 100 mM (pH 7) durante 5 min. Después fue enjuagado con solución amortiguadora de fosfatos 100 mM (pH 7) para sumergirlo en una solución de guayacol 15 mM. Las bandas pertenecientes a las isoformas de peroxidadasas se tiñeron de color rojizo.

### 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.

La Figura 3A muestra una imagen TEM de la muestra de ZnO. En esta micrografía se puede distinguir claramente la morfología de las NPsZnO cuasi-esféricas, de las cuales el 75 % mostró una distribución de tamaño de diámetros de 12 a 24 nm, y ~ 30% exhibieron tamaños mayores de 12 nm y menores de 20 nm (Figura 3B). En el caso de las NPsAg, estas se obtuvieron empleando extracto de *L. tridentata* (gobernadora) como agente reductor, las micrografías de las NPsAg presentaron morfología esférica (Figura 3C), aunque se llegaron a observar algunas ligeramente ovoides o semiesféricas, en la figura 3D se muestra el histograma de distribución del tamaño promedio de las NPsAg, el cual fue de 9 nm con un amplio intervalo de diámetro de partícula de 5 a 25 nm.



**Figura 3.** Análisis de las NPsZnO y NPsAg. Micrografías obtenidas en un microscopio electrónico de transmisión que muestran las nanopartículas de óxido de zinc (A) y plata (C). Gráficas que muestran la distribución de tamaño de las nanopartículas (B) óxido de zinc y (D) plata.

En la curva de distribución, se puede observar asimétrica y tiende a concentrarse en los intervalos de diámetros de 5-13 nm, lo que indica que la

distribución no fue muy homogénea y se generó una mayor concentración de nanopartículas con intervalos menores a los 13 nm.

### 3.2 ENSAYO DE GERMINACIÓN CON NPsZnO

Se determinó la calidad fisiológica de la semilla de pepino bajo diferentes concentraciones de NPsZnO (0, 50, 100, 200 mg L<sup>-1</sup>), para ello se evaluó el vigor de la semilla en relación a su germinación y la morfología de las plántulas, durante la primera evaluación (7 días). Se determinó el número de plántulas normales como un indicador de vigor de germinación de semillas de acuerdo a la metodología descrita por el ISTA (2014). Fue posible observar el comportamiento de las NPsZnO, estas se exponen detalladamente en el Tabla 3.

Cabe mencionar que no hubo diferencias significativas en las variables porcentaje de vigor de germinación y de germinación. Sin embargo, hubo diferencias numéricas, obteniendo valores altos en el porcentaje de germinación para las concentraciones de 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> con respecto al control, cuando la concentración se incrementó a 200 mg L<sup>-1</sup> la germinación disminuyó en aproximadamente un 10 %, esto, a causa que a mayores concentraciones de NPs exista la presencia de toxicidad.

**Tabla 3.** Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semilla de *Cucumis sativus* L. embebidas en suspensiones de NPsZnO.

CONCENTRACIÓN (mg L <sup>-1</sup> )	GERMINACIÓN (%)	VIGOR DE GERMINACIÓN (%)
0	94.8 ± 3.56 a	71.2 ± 2.33 a
50	100 ± 0 a	77.6 ± 3.25 a
100	100 ± 0 a	76.8 ± 3.44 a
200	80.6 ± 3 a	75.2 ± 2.33 a
CV %	17.89	8.58

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) CV= coeficiente de variación.

Raskar y Laware (2014) reportaron que la aplicación de NPsZnO a semillas de cebolla aumentó la germinación en concentraciones bajas ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sin embargo, estos disminuyeron significativamente a concentraciones mayores. Otros, estudios realizados con maní (*Arachis hypogaea L.*) expuesta a NPsZnO se demostró una mejoraron significativamente la tasa de germinación e índice de vigor de las plántulas, incrementando el crecimiento de la raíz, el contenido de clorofila y la acumulación de biomasa (Prasad *et al.*, 2012). Además, en un estudio de campo en el que asperjaron NPsZnO a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  al maní, reportaron una mejora en el crecimiento de las raíces, el contenido de clorofila de la hoja y la acumulación de biomasa en general (Prasad *et al.*, 2012).

Estudios recientes sugieren que las nanopartículas metálicas de óxido de zinc (Zn) son micronutrientes esenciales y actúan como un complejo promotor del crecimiento de las plantas (Priyanka, N *et al.*, 2019). Durante la segunda evaluación (14 días), se obtuvo el número de plántulas normales (PN) donde se determinó la longitud de plántula (LP) y de la radícula (LR) en plántulas normales (Tabla 4). Los resultados muestran un aumento en la longitud de las raíces de las plántulas tratadas con NPsZnO, siendo el tratamiento de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  el que tuvo un mayor efecto al inducir el crecimiento de la raíz, aproximadamente un 10% más ( $17.35 \pm 0.22 \text{ cm}$ ) con respecto al control ( $8.19 \pm 0.43 \text{ cm}$ ).

Respecto a la variable longitud de vástago (LV), se observó el mismo comportamiento que en la raíz, se incrementó la longitud del vástago con el tratamiento de las NPsZnO obteniendo el valor más alto con  $6.27 \text{ cm}$  a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de NPsZnO, siendo 1.28 veces de mayor tamaño con respuesta al control ( $4.87 \pm 0.2 \text{ cm}$ ) (Tabla 4).

Estos resultados indican que la aplicación de NPsZnO a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  aumenta la velocidad de aparición del vástago y la radícula durante los primeros siete días.

Esta respuesta es dependiente de la concentración empleada en el ensayo, observándose el mayor efecto a la concentración más alta.

**Tabla 4.** Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de longitud de semilla de *Cucumis sativus* L. embebidas en suspensiones de NPsZnO

CONCENTRACIÓN (mg L <sup>-1</sup> )	LR (cm)	LV (cm)
0	8.19 ± 0.43 a	4.87 ± 0.2 a
50	12.10 ± 0.28 b	6.19 ± 0.32 b
100	12.28 ± 0.2 b	5.93 ± 0.07 b
200	17.35 ± 0.22 c	6.27 ± 0.19 b
CV %	5.31	8.3

ab,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ), CV= coeficiente de variación, LR= longitud de raíz, LV= longitud de vástago.

Los resultados obtenidos con las NpsZnO son similares a varios reportes en la literatura que consignan un efecto positivo en la germinación y desarrollo de diferentes especies de plantas dependiente de la concentración. Estos datos concuerdan con lo reportado por Rabia Javed (2017) quienes observaron que el incremento en la concentración de NPsZnO, afectó positivamente el crecimiento de la planta además de incrementar la producción de glicósidos de esteviol. El zinc es un micronutriente para el crecimiento y desarrollo de las plantas, debido a que un gran número de proteínas contienen un dominio de unión a Zn, como lo son las proteínas reguladoras de la transcripción. Sin embargo, se ha reportado que por encima de ciertas concentraciones, este elemento se vuelve tóxico, haciendo que las plantas activen diferentes mecanismos de defensa, como el aumento de la expresión de los genes de biosíntesis de lignina y suberina en plantas tratadas con zinc, incluida *Zea mays* y *Glycine max* (López-Moreno *et al.*, 2010).

Sin embargo, diversos estudios han encontrado que, aunque tienen un efecto negativo en la elongación de la raíz, las nanopartículas no afectaron la germinación

de las semillas (Zhang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012). Los investigadores atribuyen este fenómeno a la permeabilidad selectiva de las capas de semillas, debido a que esta a su vez puede disminuir la toxicidad de otros contaminantes. La adición de NPsZnO a las semillas puede ayudar a la entrega efectiva de Zn, incrementando la tasa de germinación en 20% en comparación con las semillas no tratadas (Adhikari *et al.*, 2016).

Por otro lado, Zafar y colaboradores (2016) reportaron que a concentraciones de NPsZnO entre 500 a 1500 mg L<sup>-1</sup> afectan negativamente a la germinación de las semillas de *Brassica nigra* y el crecimiento de las plántulas aumentando los mecanismos de defensa enzimáticos antioxidantes y no enzimáticos. Sin embargo, García-López *et al.*, (2018) demostraron el efecto de los NPsZnO sobre las variables asociadas al crecimiento de las plántulas, la longitud de la plúmula no se vio afectada significativamente ( $p \leq 0.724$ ). Sin embargo, la longitud de la radícula respondió significativamente ( $p \leq 0.01$ ) con la aplicación de NPsZnO concluyendo que a medida que aumenta la concentración, la longitud de la radícula disminuye en un 50.0% (100 ppm), 53,9% (200 ppm) y 54,5% (500 mg L<sup>-1</sup>).

En otra investigación se demostró la aspersión foliar de NPsZnO en plantas de frijol mejoraron significativamente la biomasa I (27.1%), la longitud del brote (31.5%), la longitud de la raíz (66.3%), el área de la raíz (73.5%), el contenido de clorofila (276.2%) y la proteína foliar soluble total (27.1%) (Raliya *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la aplicación de NPs promueve e inhibe el crecimiento de diversas especies de plantas; el efecto está determinado por su composición química, tamaño de partícula, forma y el método utilizado para su síntesis (Rastogi *et al.*, 2017). Los efectos inhibitorios de los nanomateriales están asociados con el su absorción, transporte, transformación y degradación, además de estar influenciados por el tamaño y morfología de las NPs (Schwab *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2014). Estudios anteriores han demostrado que los NPs de óxidos metálicos pueden

ingresar a los sistemas vasculares de las plantas a través de las paredes celulares y ser transportados a ubicaciones subcelulares (Li *et al.*, 2017; Rastogi *et al.*, 2017).

### 3.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA.

#### 3.3.1 CUANTIFICACIÓN DE PROLINA CON NPsZnO.

La prolina (Pro) es un aminoácido fundamental y multifuncional que puede desempeñar un papel importante no solo en los procesos de desarrollo de las plantas sino también en las respuestas al estrés biótico y abiótico (Szepesi y Szöllősi, 2018). En términos de estrés, las plantas pueden ser compatibles con la producción de metabolitos como aminoácidos, antioxidantes y hormonas para contrarrestar los efectos del estrés y continuar creciendo. Es por ello que en este trabajo se evaluó el impacto de las NPsZnO sobre este aminoácido. Los resultados indican que a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> de NPsZnO, (20.48 ± 0.86 mg·g<sup>-1</sup>) la cantidad de prolina en la raíz fue significativamente mayor con respecto al control (15.88 ± 0.82 mg·g<sup>-1</sup>). Por otro lado, la cantidad de prolina en vástago indican que a concentraciones de 200 mg L<sup>-1</sup> de NPsZnO (39.98 ± 1.07 mg·g<sup>-1</sup>) la cantidad de prolina fue 14% más alta con respecto al control (25.81 ± 0.91 mg·g<sup>-1</sup>) (Tabla 5). Numerosos resultados han demostrado que el nivel más alto de prolina en las células vegetales correlaciona fuertemente con una mayor tolerancia al estrés en las plantas (Semida *et al.*, 2018).

**Tabla 5.** Cuantificación de prolina en plántulas de *Cucumis sativus* L. tratadas con NPsZnO.

CONCENTRACIÓN mg L <sup>-1</sup>	CANTIDAD PROLINA RAÍZ (mg·g <sup>-1</sup> )	CANTIDAD PROLINA VÁSTAGO (mg·g <sup>-1</sup> )
0	15.88 ± 0.82 a	25.81 ± 0.91 a
50	18.87 ± 0.49 b	29.83 ± 0.36 b
100	20.48 ± 0.86 b	36.36 ± 1.13 c
200	20.37 ± 0.72 b	39.98 ± 1.07 d
cv%	13.47	

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

La prolina se puede usar para reducir los efectos desfavorables del estrés oxidativo en las plantas, es una molécula de señalización que actúa como un regulador del crecimiento de las plantas al activar procesos de señalización (Rady *et al.*, 2019). Mientras tanto Mohsenzadehy *et al.*, (2017) demostraron la aplicación foliar de sulfato de zinc y NPsZnO sobre parámetros fisiológicos (contenido de clorofila y carotenoides, actividad antioxidante, contenido fenólico total, prolina, peroxidación lipídica y azúcar) del romero a bajas concentraciones aumentaron significativamente la clorofila y el carotenoide en comparación con el control. Mientras que con la alta concentración de NPs ZnO, la clorofila y el carotenoide disminuyeron en comparación con el control. La actividad de las enzimas antioxidantes aumentó con el zinc y las NPsZnO en comparación con las plantas de control. Además, la prolina, la peroxidación lipídica de membrana, el azúcar soluble y los compuestos fenólicos aumentaron en todos los tratamientos. Estos autores mencionan que el aumento de las enzimas antioxidantes y la prolina se lleva a cabo para que la planta pueda eliminar los radicales libres generados.

### **3.3.2 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA**

La clorofila es el principal pigmento de recolección de luz en plantas, están presentes en las hojas y otras partes que quedan expuestas al sol, siendo responsables de la absorción de la luz solar en el proceso de la fotosíntesis. Para saber si el tratamiento de NPsZnO tiene efecto en los pigmentos fotosintéticos, se llevó a cabo la determinación de clorifila A y B. Los resultados mostraron que el tratamiento con 100 mg L<sup>-1</sup> de NPsZnO, incremento en un 3% el contenido de clorifila A con respecto al control ( $6.92 \pm 2.19 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), para la clorofila B ( $7.65 \pm 0.69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) este incremento fue de 2.5% con respecto al control ( $5.02 \pm 1.64 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Por lo tanto, se logró observar un aumento en la cantidad total de clorofila (Tabla 6).

Diferentes estudios han mostrado que la pigmentación puede estar directamente relacionada con condiciones de estrés en la planta, el contenido de clorofilas generalmente disminuye bajo estrés y durante la senescencia (Vahtmäe

*et al.*, 2018). Los resultados obtenidos indican el papel del Zn como micronutriente vital para la planta, participando posiblemente como cofactor de diferentes enzimas involucradas en el proceso de fotosíntesis.

**Tabla 6.** Cuantificación de clorofila de plántulas *Cucumis sativus* L. tratadas con NPsZnO.

CONCENTRACIÓN mg L <sup>-1</sup>	CLOROFILA A (mg·g <sup>-1</sup> )	CLOROFILA B (mg·g <sup>-1</sup> )	CLOROFILA TOTAL (mg·g <sup>-1</sup> )
0	6.92 ± 2.19 ab	5.02 ± 1.64 ab	4.43 ± 1.44 ab
50	3.25 ± 0.13 a	2.89 ± 0.32 a	2.55 ± 0.29 a
100	9.78 ± 0.87 b	7.65 ± 0.69 b	6.75 ± 0.61 b
200	5.84 ± 0.33 a	4.55 ± 0.5 a	4.01 ± 0.44 a
cv%	36.34	37.63	37.63

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

En la literatura se ha reportado que bajo diferentes concentraciones (0, 200 y 400 mg L<sup>-1</sup>) de NPsZnO los niveles de clorofila *a* y *b*, disminuyen en comparación con el control (Hashemi *et al.*, 2018). Sin embargo, Pullagurala *et al.*, (2018) menciona que las NPsZnO expuestas a 400 mg/kg en plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*) tuvieron diferencias estadísticamente significativas, aumentando el contenido de clorofila relativa en un 41%, 37% y 58%, a 100, 200 y 400 mg / kg respectivamente, en comparación con el control. En cultivos hidropónicos de plantas de frijol (*Vigna radiata*) el suministro de NPsZnO mejoró el contenido de clorofila, proteínas y minerales (Samreen *et al.*, 2017).

### 3.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

Se estimó la concentración de proteínas a las plántulas de *Cucumis sativus* L. tratadas con NPsZnO. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre el control y los tratamientos de NPsZnO pero una variación no muy alta entre las concentraciones, indicando que con 200 mg L<sup>-1</sup> ( $34.11 \pm 0.13$  mg<sub>prot</sub>/g<sub>tej</sub>) se obtuvo el valor más destacado con un aproximado del 15% en comparación con el control

( $20.64 \pm 0.42 \text{ mg}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{tej}}$ ) (Tabla 7). Evaluando en el vástago a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  se incrementó el valor de proteína en 15% ( $51.35 \pm 0.24 \text{ mg}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{tej}}$ ) en comparación con el control ( $37.51 \pm 0.18 \text{ mg}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{tej}}$ ) con una tendencia de variación de unidades muy notoria en ambos casos, al incrementar las concentraciones de NPs se elevó el contenido de proteína en raíz y vástago.

**Tabla 7.** Contenido de proteína total de plantulas *Cucumis sativus* L. bajo el efecto de NPsZnO.

CONCENTRACIÓN $\text{mg L}^{-1}$	CANTIDAD PROTEÍNA	CANTIDAD PROTEÍNA
	RAÍZ ( $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{tej}}$ )	VÁSTAGO ( $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{tej}}$ )
0	$20.64 \pm 0.42 \text{ c}$	$37.51 \pm 0.18 \text{ c}$
50	$30.26 \pm 0.37 \text{ b}$	$48.41 \pm 0.59 \text{ b}$
100	$30.73 \pm 0.29 \text{ b}$	$51.02 \pm 0.35 \text{ a}$
200	$34.11 \pm 0.13 \text{ a}$	$51.35 \pm 0.24 \text{ a}$
cv%	3.33	2.37

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05, \leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

Diversas investigaciones han demostrado que las NPs son capaces de producir estrés en la planta, generando un exceso de ERO que puede afectar a proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN (Olejnik *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2015). La presencia de nanopartículas dentro de las células vegetales puede comportarse de manera similar a los iones metálicos y reaccionar con los grupos sulfhidrilo, carboxilo y, en última instancia, alterar la actividad de la proteína (Hossain *et al.*, 2015).

En la Tabla 8 se muestra la comparación de medias de la cuantificación de la actividad de APX, donde se observan diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) en la raíz, la actividad de APX se incrementó 2.5 veces ( $0.55 \pm 0.02 \text{ UI}/\text{mg}_{\text{prot}}$ ) con respecto al control a una concentración  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , en el vástago no se encontraron diferencias significativas comparando con el control, sin embargo, sí

se mostrarón diferencias numéricamente al momento de incrementar las concentraciones de NPs mostrando que a una concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> (0.8575 ± 0.06 UI/mg<sub>prot</sub>) incrementó los valores de APX.

**Tabla 8.** Actividades enzimáticas antioxidante de plántulas de *Cucumis sativus* L. expuestas a NPsZnO.

CONCENTRACION (mg L <sup>-1</sup> )	APX RAIZ (UI/mg <sub>prot</sub> )	APX VASTAGO (UI/mg <sub>prot</sub> )	CAT RAIZ (UI/mg <sub>prot</sub> )	CAT VASTAGO (UI/mg <sub>prot</sub> )
0	0.2226 ± 0.01 c	0.7876 ± 0.02 a	0.1929 ± 0.02 a	0.2195 ± 0.01 ab
50	0.4286 ± 0.03 b	0.8477 ± 0.02 a	0.06257 ± 0.01 b	0.1837 ± 0.01 b
100	0.5518 ± 0.02 a	0.8167 ± 0.03 a	0.09381 ± 0.01 b	0.204 ± 0.01 b
200	0.527 ± 0.02 a	0.8575 ± 0.06 a	0.1015 ± 0.002 c	0.2447 ± 0.002a
CV (%)	20.76	18.6323	41.55	21.02

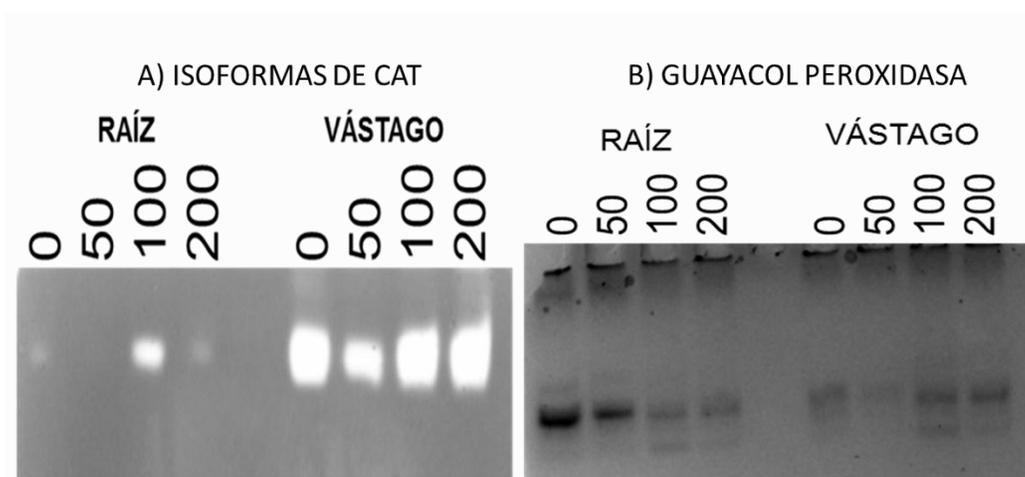
a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

Los resultados anteriores coinciden con Rao y colaboradores (2014) donde señalaron en su investigación que la actividad de APX en mostaza (*Brassica juncea*) fue mayor en las raíces en comparación con el lanzamiento y las hojas. Resultados similares fueron reportados por Schützendübel *et al.*, (2002), en raíces de *Populus canescens* donde indujeron el estrés oxidativo por la adición de cadmio (Cd) donde a las 48 h pierden por completo la actividad de APX a una concentración de 50 µM de Cd, asociándolo al incremento en la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Srivastava y Srivastava (2014) evaluaron el estrés hídrico (100, 200 y 300 mL de agua) y el control (400 mL de agua) en ejemplares de *S. rebaudiana* durante 40 días, encontrando que las actividades de POX y CAT incrementaron en las plantas moderadamente y ligeramente (200 y 300 mL de agua) comparado con el control donde la actividad de ambas enzimas disminuyó gradualmente.

Por otro lado, se observaron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) en la actividad de catalasa en raíz y en el vástago disminuyendo su actividad. Las respuestas de las NPsZnO en la variable de catalasa en raíz si hubo diferencia entre

tratamientos, disminuyo su actividad con respecto al control, mientras que, en vástago ( $0.2195 \pm 0.01$  UI/mg<sub>prot</sub>) su actividad incrementa conforme se aumentó la concentración de NPsZnO siendo que a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0.2447 \pm 0.0027$  UI/mg<sub>prot</sub>) se obtuvo el mayor actividad (Tabla 8). Estos resultados indican que la CAT podría estar actuando en el sistema de eliminación de las ERO; por lo tanto, el mantenimiento y / o aumento de su actividad y / o de su expresión es esencial para evitar daños en los compartimentos celulares, especialmente cloroplastos y peroxisomas (Silva *et al.*, 2019).

Estos resultados coinciden con lo observado en los zimogramas que permiten observar isoformas de CAT, en la figura 4A se muestra una isoforma de la enzima tanto en raíz como en plúmula, la cual fue más activa en la parte aérea de la plántula.



**Figura 4** . Zimograma de la actividad de las isoenzimas A) catalasa y B) guayacol peroxidasa, de plántulas de *Cucumis sativus* L. expuestas a NPsZnO.

La CAT enzima es esencial para minimizar la acumulación de ERO durante la fotorrespiración, especialmente en condiciones de estrés abiótico, cuando este proceso se intensifica fuertemente (Silva *et al.*, 2019). En literatura se reportan que la actividad CAT se redujo significativamente a 98.8, 86.9, 84.8, 82.1 y 70.2% en tejidos foliares cuando se aplicó NPsZnO (25, 50, 75, 100 y  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) en comparación con el control, se observó que al aumentar las concentraciones de

NPsZnO en el medio, el nivel de actividad CAT disminuyó significativamente y la reducción máxima se observó a 200 mg L<sup>-1</sup>.

Desai *et al.* (2015), observaron la fitotoxicidad de la adición de diferentes concentraciones de NPs ZnO (50, 100, 200, 400 y 1000 mg/L) en plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana*, encontrando que la maquinaria antioxidante enzimática fue activada, con 1000 mg/L obtuvieron la mayor actividad de CAT y SOD.

Adicionalmente se estudió el patrón de isoenzimas de guayacol peroxidasas (POX) mediante análisis PAGE nativo y se observó un total de 3 isoformas para la enzima POX en el patrón de bandas de isoenzimas (Figura 4B). Las tres isoformas se observaron en plántula control (en raíces) mientras que en los tratamientos con NPsZnO, la isoforma 1 fue desapareciendo conforme se incrementaba la concentración. La intensidad de la isoforma 2 de POX disminuyó con respecto a la concentración en raíces. Sin embargo, en la parte aérea el comportamiento fue contrario, la isoforma 1 y 2 apareció conforme incremento la concentración de NPsZnO.

Se sabe que la presencia de nanopartículas dentro de las células vegetales puede comportarse de manera similar a los iones metálicos y reaccionar con los grupos sulfhidrilo, carboxilo y, alterando la actividad de la proteína (Hossain *et al.*, 2015). En este estudio, el patrón de isoenzima de peroxidasa reveló que la adición de NPsZnO provocó la sobreexpresión de una de las isoformas de POX. Los resultados en este documento sugieren que la producción excesiva de isoforma en particular puede estar involucrada en evitar la toxicidad inducida por el estrés oxidativo ocasionado por las nanopartículas.

Los metales pesados causan la generación de ERO que posteriormente desencadenan el nivel de enzimas antioxidantes, incluidos CAT, APX y POX como mecanismo regulador para proteger a las células vegetales del estrés oxidativo. La

CAT, APX y POX se activaron efectivamente en las plantas tras la adición de NPsZnO. Estos resultados concuerdan con los hallazgos anteriores en otras plantas (Malar *et al.*, 2014b, Tripathi *et al.*, 2015, Manikandan *et al.*, 2016). Hernández-Viezcasa *et al.*, (2011) observaron que las NPsZnO aumentaron la actividad CAT y APX en *Prosopis juliflora-velutina*. Krishnaraj *et al.*, (2012) informaron que se encontró que los niveles de CAT y POX eran significativamente altos bajo la exposición a nanopartículas de plata en *B. monnieri*. Trujillo-Reyesa *et al.*, (2014) observaron una mayor actividad de CAT en plantas de lechuga tratadas con NPsFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

### **3.5 ENSAYO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE PEPINO BAJO ESTRÉS POR NPsAg.**

De igual manera se determinó la calidad fisiológica de la semilla de pepino bajo diferentes concentraciones de NPsAg (0, 50, 100, 200 mg L<sup>-1</sup>), analizando los cambios inducidos por este nanomaterial, en el vigor de la semilla en relación a su germinación y morfología de las plántulas, dentro de los parámetros estipulados en la metodología (ISTA, 2014). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas que con el tratamiento de las NPsAg; el porcentaje de germinación disminuyó un 6 % al aumentar la concentración a 200 mg L<sup>-1</sup> (94 ± 2.52 %) respecto al control (100 ± 0 %); sin embargo, a concentraciones de 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> no se observó ningún cambio. Por otro lado, el porcentaje de vigor de germinación incremento un 7% en el tratamiento de 100 mg L<sup>-1</sup> (85.60 ± 2.04 %) en comparación con el control (78.40 ± 2.04%). Esto cambios observados, pueden deberse a que las NPsAg interfieren con las actividades de ciertas enzimas hidrolíticas, requeridas durante el proceso de germinación (Gupta *et al.*, 2018).

Thangavelu *et al.*, (2019) demostraron que las NPs Ag son capaces de romper la dormancia de semillas de *Withania somnifera* incrementando el porcentaje de germinación en 50 %, este porcentaje se mejoró con respecto a diferentes tratamientos con giberelinas y otros compuestos inductores de germinación. De acuerdo con la literatura se menciona que las NPsAg forman complejos con la cubierta de la semilla que permiten el paso de agua, mejorando su absorción o

activación de enzimas necesarias para el proceso de germinación, mejorando la actividad de  $\alpha$ -amilasa, producen más especies reactivas de oxígeno e inciden en la hidrólisis del almidón para mantener el crecimiento del embrión, que da como resultado de una semilla vigorosa (Mahakham *et al.*, 2017; Lawar y Raskar, 2014).

**Tabla 9.** Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semilla de *Cucumis sativus* L. embebidas en suspensiones de NPsAg.

CONCENTRACIÓN ( mg L <sup>-1</sup> )	GERMINACIÓN (%)	VIGOR DE GERMINACIÓN (%)
0	100 ± 0 b	78.40 ± 2.04 a
50	100 ± 0 b	83.20 ± 2.33 ab
100	100 ± 0 b	85.60 ± 2.04 b
200	94 ± 2.52 a	83.20 ± 2.33 ab
CV %	2.28	5.93

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación, vigor de germinación= plántulas normales al primer conteo, germinación= plántulas normales al segundo conteo.

Almutairi y Alharbi (2015) evaluaron el efecto de NPs Ag sobre la germinación de tres especies de plantas: maíz, sandía y calabacita, en donde las NPs Ag mejoraron la tasa de germinación para las tres plantas; además de incrementar el porcentaje de germinación para plantas de sandía y calabacita en comparación con semillas no tratadas.

Por otro lado, Thuesombat y colaboradores (2014) reportaron que a concentraciones de 100 y 1000 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg inhibieron el crecimiento del brote y de la raíz en plantas de arroz. En general, la toxicidad de las NPsAg depende de propiedades como el recubrimiento, diámetro, forma, área y carga superficial y de la especie de planta (Haghighi y Silva, 2014; Scherer *et al.*, 2019).

En el largo de la plúmula (LP) se obtuvo una diferencia significativa ( $p > 0.01$ ), en el tratamiento con  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $7.21 \pm 0.1 \text{ cm}$ ), siendo sus plántulas 1.33 veces más altas con respecto al control ( $5.42 \pm 0.21 \text{ cm}$ ; Tabla 10). Por otro lado, el largo de la raíz presento un comportamiento similar siendo las concentraciones de  $100$  y  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , las que incrementaron su longitud 3.6 veces más ( $17.14 \pm 0.34 \text{ cm}$ ;  $14.62 \pm 0.21 \text{ cm}$ ) con respecto al control ( $4.67 \pm 0.24 \text{ cm}$ ).

Las NPsAg tienen efectos significativos sobre el crecimiento y el rendimiento de las plantas de cultivo que dependen de la superficie, el tamaño y la estabilidad de la protección (Lu *et al.*, 2010). Los resultados demostraron que la exposición a NPsAg puede incrementar la germinación de las semillas, el crecimiento de las raíces y del vástago, pero al incrementar las concentraciones redujeron el crecimiento tanto en raíz como en vástago esto conlleva que a mayores concentraciones exista presencia de toxicidad.

**Tabla 10.** Comparaciones de medias de las variables evaluadas en el ensayo de germinación de semilla de *Cucumis sativus* L. embebidas en suspensiones de NPsAg.

CONCENTRACIÓN $\text{mg L}^{-1}$	LR (cm)	LV (cm)
0	$4.67 \pm 0.24 \text{ a}$	$5.42 \pm 0.21 \text{ a}$
50	$10.26 \pm 0.18 \text{ b}$	$6.74 \pm 0.25 \text{ bc}$
100	$17.14 \pm 0.34 \text{ d}$	$7.21 \pm 0.1 \text{ c}$
200	$14.62 \pm 0.21 \text{ c}$	$6.46 \pm 0.18 \text{ b}$
CV %	4.79	6.58

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ )  
 TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación, LMR= longitud media de raíz,  
 LMV= longitud media de vástago.

Zuverza-Mena y colaboradores (2016), evaluaron el efecto de las NpsAg en el alargamiento de plántulas de rábano (*Raphanus sativus*) donde hubo una reducción en el alargamiento de la raíz ( $r^2 = 0.9626$ ) que alcanzó significación

estadística en plántulas expuestas a 250 y 500 mg / L con respecto al control. Las reducciones porcentuales en los dos tratamientos fueron 27.3 y 47.7%, respectivamente. Además, la longitud de la raíz de las plántulas expuestas a 500 mg / L (5.2 cm) fue estadísticamente menor en comparación con la longitud de las raíces expuestas a 250 mg / L (7.2 cm). Sin embargo (Fayez-K *et al.*, 2017) mostraron en su experimento que el tratamiento con NPsAg de 0.1 mM causó un aumento en los brotes y la longitud de las raíces de las plántulas de cebada, este aumento puede atribuirse a la mejora de algunas actividades enzimáticas. Sin embargo, las NPsAg a 0.5 y 1 mM disminuyeron la longitud de la raíz y el brote, con una reducción más notable en la longitud de la raíz que el brote.

Al-Hugail y colaboradores (2018) reportaron resultados similares con plántulas de *Lupinus termis* expuestas a NPsAg observaron que a concentraciones superiores a 100 mg L<sup>-1</sup> causaban una disminución estadísticamente significativa en la longitud de la raíz y el brote que la inhibición de los parámetros de crecimiento de las plántulas se han considerado como el indicador principal de la fitotoxicidad de NPsAg, especialmente con concentraciones altas. Song *et al.*, (2013) demostraron que las NPsAg tenían efectos negativos en el crecimiento de la raíz de paltas de tomate incluso en la concentración más baja utilizada en su ensayo (50 mg L<sup>-1</sup>).

Diversos estudios han referido que estos efectos de elongación se deben a la regulación positiva que tienen las NPsAg en proteínas como la CDK-2 (ciclo de división celular quinasa-2), 1,6-bisfosfato aldolasa, protoclorofilida oxidorreductasa. También a la expresión de genes implicados en el metabolismo celular, IAA-8 (proteína 8 de ácido acético de indol), RD22 (sensible a la deshidratación) y NCED3 (dioxigenasa de 9-cis-epoxicarotenoide) (Siddiqui *et al.*, 2015). Por otro lado, se han registrado impactos negativos de las NPsAg en la germinación de semillas de: arroz, cebada, frijol y nabo, los cuales son dependientes de la dosis (Thuesombat *et al.*, 2014; Thiruvengadam *et al.*, 2014; El-Temsah y Joner 2012). En *Arabidopsis thaliana*, la inhibición del alargamiento de la raíz en las plántulas es mediada por la

activación de ACC (ácido aminociclopropano-1-carboxílico) que tiene un efecto cascada sobre varias enzimas que inhiben la biosíntesis de etileno (Siddiqui *et al.*, 2015).

### 3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA.

#### 3.6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROLINA.

Las NPsAg incrementó el contenido de prolina 1.16 veces ( $22.71 \pm 0.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) más la raíz se a una concentración elevada comparado con el control ( $20.33 \pm 0.89 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a una concentración de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . Estos resultados pueden deberse a que la prolina se acumula en grandes cantidades, cuando las plantas están expuestas al estrés. En lo que corresponde a cantidad de prolina en vástago, se reporta también que a la misma concentración incrementó 1.04 veces más ( $29.85 \pm 0.61 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) comparado en el control ( $28.67 \pm 0.91 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), cabe mencionar que la prolina es un índice excelente del estrés existente experimentado por la planta, ya que el nivel de prolina disminuye después de disminuir los niveles de estrés en la célula.

**Tabla 11.** Cuantificación de prolina en plántulas de *Cucumis sativus* L. expuesta a NPsAg.

CONCENTRACIÓN ( $\text{mg L}^{-1}$ )	CANTIDAD PROLINA RAÍZ ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	CANTIDAD PROLINA PLÚMULA ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
0	$20.33 \pm 0.89$ bc	$28.67 \pm 0.91$ ab
50	$17.94 \pm 1.07$ ab	$26.98 \pm 1.08$ a
100	$15.97 \pm 0.92$ a	$28.08 \pm 0.62$ ab
200	$22.71 \pm 0.7$ c	$29.85 \pm 0.61$ a
cv%	16.29	10.19

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

En estudios similares con plantas de trigo (*Triticum aestivum L.*) y frijol (*Vigna radiataL*) se ha asociado el incremento del contenido de prolina con toxicidad inducida por las NPsAg (Barbasz *et al.*, 2016; Nair *et al.*, 2015). Sin embargo, Sharma y colaboradores (2012) señalaron que el contenido de prolina disminuyó drásticamente en las plántulas tratadas con concentraciones variables de NPsAg, sus resultados demostraron por primera vez que la presencia de NPsAg en los medios de crecimiento puede mejorar el crecimiento de las plántulas de *B. juncea* al mejorar su estado antioxidante.

### **3.6.2 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA**

La clorofila tiene un papel esencial en la fotosíntesis, ya que actúa como el centro de captura de luz, por lo que cualquier alteración en la clorofila podría afectar el crecimiento de la planta de manera perjudicial (Reddy *et al.*, 2018). Los resultados mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en las variables de clorofila a, b y el total. Respecto a la variable de clorofila A, el tratamiento que tuvo el valor más elevado fue a una concentración de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $7.38 \pm 0.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) comparada con el control ( $3.03 \pm 0.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) mostrando que al ir incrementando las concentraciones estos pigmentos fueron disminuyendo. La clorofila B presentó el valor más alto con el tratamiento de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $6.36 \pm 0.78 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), por lo tanto, se obtuvo la variable total con un rango de diferencia de 3.53% ( $5.36 \pm 0.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) comparado con el control ( $1.83 \pm 0.07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), tomando en cuenta que al elevar las concentraciones de NPsAg a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  disminuye el contenido de clorofila en los parámetros evaluados.

**Tabla 12.** Cuantificación de clorofila en plantulas de *Cucumis sativus* L. bajo estrés con NPsAg.

CONCENTRACIÓN mg L <sup>-1</sup>	CLOROFILA A (mg·g <sup>-1</sup> )	CLOROFILA B (mg·g <sup>-1</sup> )	CLOROFILA TOTAL (mg·g <sup>-1</sup> )
0	3.03 ± 0.08 a	2.07 ± 0.08 a	1.83 ± 0.07 a
50	6.88 ± 0.23 b	5.74 ± 0.73 b	4.82 ± 0.48 b
100	7.38 ± 0.97 b	6.36 ± 0.78 b	5.36 ± 0.51B
200	4.69 ± 0.65 a	3.47 ± 0.55 a	3.06 ± 0.49 a
cv%	27.8	27.34	27.34

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

Los resultados obtenidos para el contenido de clorofila coinciden con los reportados por Razzaq *et al.*, (2015), quienes en trigo cultivado in vitro encontraron que la clorofila total aumentó significativamente a concentraciones de 25, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs. Por otro lado Salama (2012), reporto en frijoles (*Phaseolus vulgaris*) y maíz (*Zea mays*) que la aplicación de 60 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg promovió el crecimiento y el contenido de clorofila. En el frijol mungo (*Vigna radiata*) Saeideh *et al.*, (2014), reportaron un aumento en el contenido de clorofila a concentraciones de 50 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg.

En la literatura se reporta resultados similares donde se expone el efecto de las NPsAg sobre el crecimiento y los parámetros bioquímicos del trigo (*Triticum aestivum* L.) la aplicación de 5 mM de NPsAg aumentó significativamente el contenido total de clorofila en comparación con el control, sin embargo a 10 mM junto con estrés salino se registró el valor más bajo (Mohamed *et al.*, 2017). Al igual que recientemente se reportó un aumento en el contenido de pigmentos fotosintéticos en los brotes de vainilla y caña de azúcar tratados con NPsAg, este efecto probablemente se debió al aumento en las concentraciones de N, Mg y Fe en los tejidos vegetales expuestos a NPsAg, ya que estos elementos están asociados con la clorofila (Spinoso-Castillo, J. L. *et al.* 2017; Bello-Bello, J. J. *et al.*,

2017). Siendo el N es esencial en moléculas como la clorofila, las proteínas y los ácidos nucleicos, mientras que el Mg es necesario para las reacciones que involucran trifosfato de adenosina (ATP) y se encuentra en el resto de porfirina de la molécula de clorofila, mientras que el Fe es importante en el grupo catalítico de las enzimas redox.

Algunos autores han informado que las NPsAg mejoraron la eficiencia cuántica del fotosistema en algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Matorin *et al.*, 2013) y el fotosistema II en mostaza marrón (*Brassica juncea*) (Sharma *et al.*, 2012). El conocimiento sobre las interacciones de las NPsAg con la maquinaria fotosintética proporciona conocimiento sobre el estrés oxidativo inducido por el material y el sistema de defensa antioxidante en las plantas.

### **3.7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE**

Los resultados muestran diferencias significativas en ambos parámetros evaluados. Reportando que la respuesta que se obtuvo del contenido de proteína en raíz, se mostró una pequeña diferencia entre las concentraciones, indicando que con 200 mg L<sup>-1</sup> se obtuvo el valor más elevado de proteína (35.13 ± 0.08 mg<sub>prot</sub>/g<sub>tej</sub>) con un 14 % de diferencia con respecto al control (21.04 ± 0.14 mg<sub>prot</sub>/g<sub>tej</sub>). En cuanto al comportamiento de proteína en vástago se hace notar que a una concentración 100 mg L<sup>-1</sup> (52.7 ± 0.16 mg<sub>prot</sub>/g<sub>tej</sub>) se obtuvo el valor más elevado con una diferencia aproximada del 18 % superando al control (34.3 ± 0.7 mg<sub>prot</sub>/g<sub>tej</sub>). Cabe mencionar que el aumento de proteínas en ciertas concentraciones sugiere el límite de dosis óptimo para crecimiento de plantas.

**Tabla 13.** Efecto de las NPsAg en el contenido de proteína de plántulas *Cucumis sativus* L.

CONCENTRACIÓN mg L <sup>-1</sup>	CANTIDAD PROTEÍNA RAÍZ (mg <sub>prot</sub> /g <sub>tej</sub> )	CANTIDAD PROTEÍNA VÁSTAGO (mg <sub>prot</sub> /g <sub>tej</sub> )
0	21.04 ± 0.14 a	34.3 ± 0.7 a
50	31.47 ± 0.09 b	50.92 ± 0.57 b
100	31.99 ± 0.04 c	52.7 ± 0.16 c
200	35.13 ± 0.08 d	52.02 ± 0.3 bc
cv%	0.94	3.04

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

Latif, HH y colaboradores (2017) reportaron que el efecto de los NPsAg sobre el contenido de proteínas de la planta de trigo fue significativo. La aplicación de NPsAg sintetizados a partir de *O. basilicum* concentraciones de 20, 40 y 60 mg L<sup>-1</sup> indujo un aumento significativo en el contenido de proteínas de las plantas de trigo. Mientras tanto, que la aplicación de NPsAg sintetizados a partir de *M. indica* a 20 y 40 mg L<sup>-1</sup> indujo un aumento significativo en comparación con el control. Sin embargo, a 60 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg se mostró una reducción significativa del contenido de proteínas.

Resultados similares fue lo que reportó Salama, HM (2012) señaló en su investigación el efecto de las NPsAg a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg L<sup>-1</sup> donde se evaluó en el contenido de proteínas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) y el maíz (*Zea mays*) fueron significativos. La aplicación de NPsAg en concentración de 20, 40 y 60 mg L<sup>-1</sup> causó un aumento en contenido de proteína de las dos plantas probadas. A los 60 mg L<sup>-1</sup> se mostró un aumento significativo en el contenido de proteína (30% para frijol común y 24% para maíz) con respecto al control. Por otro lado, a una dosis de 100 mg L<sup>-1</sup>, disminuye significativamente (32% para frijol común y 18% para maíz) con respecto al control.

Las NPsAg tuvieron un efecto también en las actividades enzimáticas antioxidantes, en la tabla 14 se muestra la comparación de medias de la cuantificación de la actividad de APX y CAT con diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ). La actividad de APX en raíz incremento en promedio 1.19 veces en comparación con el control ( $0.36 \pm 0.01$  UI/mg<sub>prot</sub>), sin diferencias significativas entre concentraciones de plata, mientras que en el vástago se presentó un aumento significativo al aumentar la concentración a 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> ( $0.48 \pm 0.01$ ,  $0.49 \pm 0.01$ ), marcando una diferencia de 1.13 veces mayor comparado con el control ( $0.43 \pm 0.01$ ).

**Tabla 14.** Cuantificación de actividad enzimáticas antioxidantes de plántulas de *Cucumis sativus* L. expuestas a NPsAg.

CONCENTRACIÓN (mg L <sup>-1</sup> )	APX RAIZ (UI/mg <sub>prot</sub> )	APX VASTAGO (UI/mg <sub>prot</sub> )	CAT RAIZ (UI/mg <sub>prot</sub> )	CAT VASTAGO (UI/mg <sub>prot</sub> )
<b>0</b>	0.36 ± 0.01 a	0.43 ± 0.01 a	0.10 ± 0.01 a	0.16 ± 0.01 ab
<b>50</b>	0.43 ± 0.01 b	0.45 ± 0.01 a	0.12 ± 0.01 b	0.18 ± 0.01 b
<b>100</b>	0.44 ± 0.01 b	0.48 ± 0.01 b	0.17 ± 0.01 b	0.20 ± 0.02 b
<b>200</b>	0.45 ± 0.01 b	0.49 ± 0.01 b	0.23 ± 0.01 c	0.25 ± 0.02 a

a,b,c= niveles de significancia al 0.05 y 0.01 de probabilidad (Duncan,  $p \leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ) TNPs= tipo de nanopartícula, CV= coeficiente de variación.

Gupta y colaboradores (2018) reportaron el efecto de NPsAg en plántulas de arroz (*Oryza sativa* L., cv. Swarna) en condiciones in vitro, en las cuales se demostró un aumento repentino en las actividades de las enzimas CAT, APX y GR, de, 1.36, 2.18 1,25 veces, respectivamente, sobre el control tras la exposición a 10 mg L<sup>-1</sup>. La magnitud del aumento en el nivel de actividad de CAT no se modificó significativamente con la creciente concentración de NPsAg. Sin embargo, la actividad de APX se redujo en adelante 20 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg.

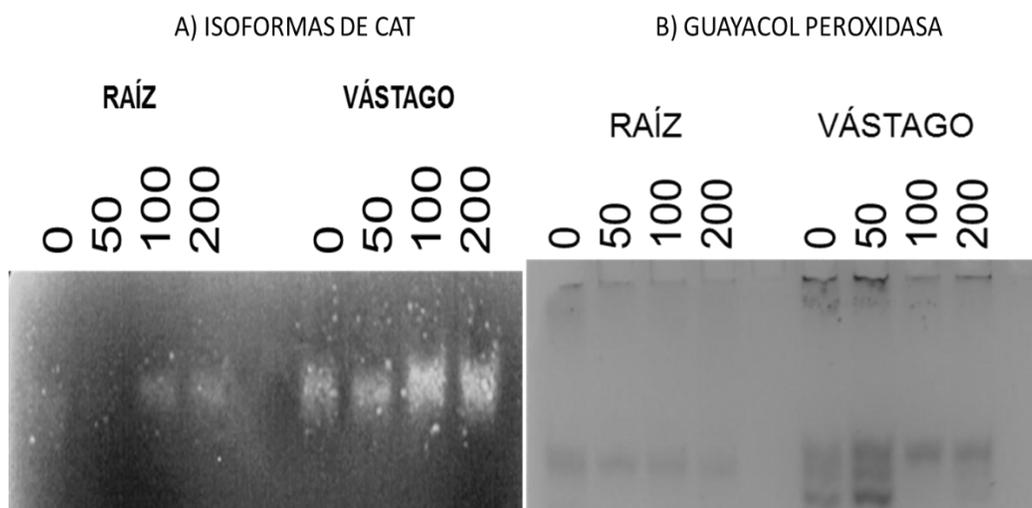
Varga y colaboradores (2018) reportó el efecto de las NPsAg sobre plantas de lenteja de agua *Lemna gibba* demostrando que la actividad de (APX) muestra un efecto significativo de la actividad APX más alta se midió después de 24 h de tratamiento con 1 mg L<sup>-1</sup> Ag cuando estaba un 93% por encima del valor de control. La comparación de la actividad APX dentro del tratamiento con una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> en diferentes puntos de tiempo mostró que la actividad enzimática disminuyó después de 48 h, aunque este valor todavía era significativamente superior a la actividad en las muestras de control (70% más).

Se muestran los resultados del análisis de comparación de medias (Cuadro 14), donde se observaron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) en las variables de la actividad de CAT en raíz y en vástago con diferentes 200 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg, incrementando ( $0.23 \pm 0.01$  UI/mg<sub>prot</sub>) mostró diferencia con un 2.3 veces su actividad en la raíz con respecto al control ( $0.10 \pm 0.01$  UI/mg<sub>prot</sub>) y de 1.5 veces más ( $0.25 \pm 0.02$  UI/mg<sub>prot</sub>) comparado con el control ( $0.16 \pm 0.01$  UI/mg<sub>prot</sub>). Esto se debe que las catalasas son enzimas altamente activas y en un intento por controlar los niveles de ROS, se producen mecanismos de defensa, como la sobreexpresión de enzimas antioxidantes (Puač *et al.*, 2018).

Estos resultados coinciden con lo observado en los zimogramas en donde se observa una mayor actividad de CAT conforme se incrementa la concentración de NPsAg (figura 5). También se puede distinguir una isoforma de la enzima tanto en raíz como en vástago.

En la literatura se reportan estudios similares donde la exposición de diversas especies de plantas a NPsAg incrementa la actividad de CAT esto podría deberse a una mayor producción de ERO (KHAN *et al.*, 2019; Homaei *et al.*, 2016; Galazzi, RM *et al.*, 2019). De igual manera se reporta los efectos de la exposición de NPsAg con semillas de Soja se detectó un aumento en la actividad de CAT en comparación con sus controles respectivos, para la soja NT, el cultivo con NPsAg condujo a un aumento de 33% y 23% en actividad de CAT, respectivamente. Para la soja T, el

cultivo con NPsAg aumentaron la actividad de CAT en 98% y 47%, respectivamente. Los resultados sugieren que la soja T mostró una mayor respuesta en términos de actividad de CAT a ambos tipos de cultivo que la soja NT.



**Figura 5.** Zimograma de la actividad de las isoenzimas A) catalasa y B) guayacol peroxidasa, del cultivo de *Cucumis sativus L.* tratadas con NPsAg.

Adicionalmente de analizo el patrón de isoenzimas de guayacol peroxidadas (POX) mediante análisis PAGE nativo y se observó un total de 4 isoformas para la enzima POX en la plúmula (figura 5) las cuales con el incremento de la concentración de NPsAg fueron desapareciendo, en la raíz solo se puedo apreciar una isoforma que tuvo el mismo comportamiento.

Vishwakarma y colaboradores (2017) informó que CAT y POX son enzimas que juegan un papel importante para garantizar la protección contra la oxidación, daños en plantas expuestas a tratamientos con NPsAg. Mientras tanto (Fayez *et al.*, 2017) mencionó que la actividad POX de las hojas de cebada aumentó significativamente debido a los tratamientos con NPsAg. En respuesta a 0.5 y 1.0 mM, las actividades de POX aumentaron en 21.2 y 26.5%, respectivamente, en comparación con el control. En respuesta a NPsAg 0.5 mM, la actividad POX aumentó en 41.5% en comparación con el control. Sin embargo, con el tratamiento con NPsAg 1 mM, la actividad POX fue aproximadamente igual a la del control.

#### 4. CONCLUSIONES

La aplicación de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y de plata (NPsAg) son efectivas como promotores del vigor y germinación en semillas de *Cucumis sativus* L. a bajas concentraciones ( $<200 \text{ mg L}^{-1}$ ). Este proceso fue mediado por la producción controlada de ERO a través de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

La disminución de la germinación y del porcentaje de vigor se encontró relacionada con la inducción de estrés oxidativo causado por la aplicación de altas concentraciones de nanopartículas ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) que llevó al deterioro de pigmentos, proteínas e inactivación del sistema enzimático antioxidante.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, A.A., David, W.P., Sánchez, S.T., Sánchez, K.T. (2019). Efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*) en pepino. *Agronomía Costarricense*.
- Ahmed, T., Imdad, S., Yaldram, K., Butt, N.M., Pervez, A. (2014). Emerging nanotechnology-based methods for water purification: a review. *Desalination and Water Treatment*, 52(22-24), 4089-4101.
- Al-Huqail, A.A., Hatata, M.M., Al-Huqail, A.A., Ibrahim, M.M. (2018). Preparación, caracterización de fito nanopartículas de plata y su impacto en el potencial de crecimiento de las plántulas de *Lupinus termis* L. *Revista saudita de ciencias biológicas*, 25(2), 313-319.
- Almutairi, Z.M., Alharbi, A. (2015). Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *Jurnal. Advances. Agriculture*, 4(1), 283-288.
- Alvarado, R., Solera, F., Vega-Baudrit, J. (2014). Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de cinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(3), 134-148.
- Amaguaña., Pacheco, D.I. (2018). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando como reductor químico el extracto acuoso de las hojas de sensitiva (*Mimosa albida*) (Bachelor's thesis, puce-Quito).
- Aouada, F.A., De Moura, M.R. (2015). Nanotechnology Applied in Agriculture: Controlled Release of Agrochemicals. In *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Springer International Publishing. Pp103-118.
- Ardakani, A.S. (2013). Toxicidad de las nanopartículas de plata, titanio y silicio en el nematodo del nudo de la raíz, *Meloidogyne incognita*, y los parámetros de crecimiento del tomate. *Nematología*, 15 (6), 671-677.

- Arias García, F.I., De la Rosa Álvarez., M.G. (2015). Toxicidad de nanopartículas metálicas en maíz y girasol, especies de interés económico y alimentario de la región del Bajío. *Jóvenes en la ciencia* 1(2), 424-428.
- Balestrasse K.B., Gardey L., Gallego S.M., Tomaro M.L. (2001). Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28, 497-504.
- Barbasz, A., Kreczmer, B., Oćwieja, M. (2016). Efectos de la exposición de las células callosas de dos variedades de trigo a nanopartículas de plata y sal de plata (AgNO<sub>3</sub>). *Acta physiologiae plantarum*, 38(3), 76.
- Burman, U., Saini, M., Kumar, P. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(4), 605-612.
- Calle G.N. (2010). Nanotecnología conceptos generales. RITS, 7-9.
- Capaldi, A.S.C., Diniz, S.A.L., Moretto, G.R., Antunes, A.R., Zezzi, A.M.A. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, 131, 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1997). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59: 527-535.
- Corbett, J., McKeown, P.A., Peggs, G.N., Whatmore R. (2000). Nanotechnology: International Developments and Emerging Products. *CIRP Annals. Manufac Techn*, 49(2): 523-545.
- De la rosa, G., Mendoza, Á., Molina, C. (2017). Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: Implications on future design. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 226-235. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.014>
- De, Ariño., Otxoa, A. (2018). Nanotecnología y seguridad alimentaria. *Nutrición Hospitalaria*, 35(4), 146-149.

- Desai, C.V., Desai H.B., Suthar K.P., Singh D., Patel R.M., Taslim A. (2015). Phytotoxicity of zinc-nanoparticles and its influence on stevioside production in *Sgtevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Biological Research*, 17(1), 1-7.
- Devaraj, P.P.K., Aarti, C., Renganathan, A. (2013). Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Cannonball Leaves and Their Cytotoxic Activity against MCF-7 Cell Line. *Journal of Nanotechnology*, 3(6), 107-112.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., Goldbach, H.E. (2008). Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia plantarum*, 134(1):151-160.
- Fages, S.E. (2012). Investigación de fibras de polipropileno aditivas como nanopartículas de plata para la mejora de propiedades bioactivas en el sector textil. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 399 pp.
- Fayez, K.A., El,Deeb, B.A., Mostafa, N.Y. (2017). Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(7), 155.
- Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, M., Shujait Ali. S., Khan, A., Wei, D.Q (2019). Producción sostenible de biomasa y metabolitos secundarios de importancia industrial en cultivos celulares de autocuración (*Prunella vulgaris* L.) provocados por nanopartículas de plata y oro. *Células artificiales, nanomedicina y biotecnología*, 47(1), 2553-2561.
- Flores Rodríguez, J.A., Ruiz Torres, N.A., Lira Saldivar, R.H., Flores Naveda, A. (2018). Comportamiento fisiológico de la germinación de semilla de melón (*Cucumis melo*) debido a la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc comerciales y sintetizadas.
- Fúnez, A.Á., Duaso, A.I.H., Gómez, P.M. (2016). Nanotecnología en la industria alimentaria aplicaciones/nanotechnology in the food industry i: applications. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(2), 1.
- Galazzi, R.M., Júnior, C.A.L., de Lima, T.B., Gozzo, F.C., Arruda, M.A.Z (2019). Evaluación de algunos efectos sobre el metabolismo de las plantas a través de proteínas y

enzimas en la soja transgénica y no transgénica después del cultivo con nanopartículas de plata. *Revista de proteómica*, 191, 88-106.

García López, J., Zavala García, F., Olivares Sáenz, E., Lira-Saldívar, R., Díaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N., Niño-Medina, G. (2018). Las nanopartículas de óxido de zinc aumentan los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de *Capsicum annuum* L. durante la germinación. *Agronomía*, 8(10), 215.

García Rodríguez, D. A. (2018). nano fertilizantes y promotores del crecimiento de plantas para una agricultura sustentable usando nanopartículas metálicas y grafenos. Instituto tecnológico de colima.

Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., Geisler, M. (2014). Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials*, 4(2), 301-318.

Ghosh, M., Jana, A., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A., Chakraborty, A., Mukherjee, A. (2016). Effects of ZnO nanoparticles in plants: Cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807, 25-32.

Gill S. S. y Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*. 48, 909-930.

Guerrero, V., Rivas, J., Rosas, N., Valdivieso, C. (2013). Obtención de nanopartículas de óxidos de cinc y circonio por el método de Pechini. In *VIII Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE 2013, Sangolquí, Ecuador*.

Gupta, S.D., Agarwal, A., Pradhan, S. (2018). Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: an insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns. *Ecotoxicology and environmental safety*, 161, 624-633.

Homaee, M. B., Ehsanpour, A. A. (2016). Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57(6), 544-553.

- Hussain, I., Singh, N.B., Singh, A., Singh, H., Singh S.C (2016) Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnol Lett* 38(4):545–560
- Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Visnapuu, M. (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PloS one*, 9(7)e102108.
- Jaimes, J., Rios, I., Severiche, C. (2017). Nanotecnología y sus aplicaciones en la industria de alimentos-Nanotechnology and its applications in the food industry. *Alimentos Hoy*, 25(41), 51-76.
- Jasim, B., Thomas, R., Mathew, J., Radhakrishnan, E. K. (2017). Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 443-447.
- Khan, I., raza, M., awan, S., khalid, M., raja, N., Min, S., zhang, X. (2019). in vitro effect of metallic silver nanoparticles (agnps): a novel approach toward the feasible production of biomass and natural antioxidants in pearl millet (*pennisetum glaucum* l.). *applied ecology and environmental research*, 17(6), 12877-12892.
- Kumar, A., Gupta, K., Dixit, S., Mishra, K., Srivastava, S. (2019). A review on positive and negative impacts of nanotechnology in agriculture. *International journal of environmental science and technology*, 16(4), 2175-2184.
- Latif, H.H., Ghareib, M., Tahon, M.A (2017). Fitosíntesis de nanopartículas de plata usando extractos de hojas de *Ocimum basilicum* y *Mangifera indica* y su efecto sobre algunos atributos bioquímicos de *Triticum aestivum*. *Gesunde Pflanzen*, 69(1), 39-46.
- León Moreta, E.F. (2016). Evaluación de tres variedades de pepino *Cucumis sativus* L. con tres dosis de fertilizante foliar de fitohormonas y quelato orgánicos e inorgánicos en medios semihidropónicos (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil).
- Leopoldo, A. (2015). Pepino para todas las épocas. *Revista productores de Hortalizas*, 9(3), 296.

- Li, X., Ke, M., Zhang, M., Peijnenburg, W.J.G.M., Fan, X., Xu, J., Qian, H. (2018). Los efectos interactivos de las nanopartículas de diclofop-metilo y plata en *Arabidopsis thaliana*: crecimiento, fotosíntesis y sistema antioxidante. *Contaminación ambiental*, 232, 212-219.
- Lin, D., Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental science & technology*, 42(15), 5580-5585.
- Lira Saldívar, R.H., M. Hernández-Suarez., R. Betancourt-Galindo., L.A García-Cerda., L. Tolentino Alfonso. (2014). Actividad antifúngica de nanopartículas de cobre y óxido de zinc-plata contra (*Botrytis cinérea*). *Congreso Internacional Metalúrgica y materiales*. Pp 11
- Lira Saldivar, R.H., Méndez Argüello, B., De los Santos Villareal, G., Vera Reyes, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*, 28(2), 9-24.doi: 10.15174/au.2018.1575
- Lira Saldivar, R.H., Méndez-Argüello, B. (2018). Nanotecnología: Un nuevo paradigma científico en la producción agropecuaria del siglo XXI. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 5(13), 1-2.
- Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P.A., Trbojevich, R., Fernandez, A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 24(1), 19-29.
- Loo, S.L., Krantz, W.B., Fane, A.G., Gao, Y., Lim, T.T., Hu, X. (2015). Bactericidal mechanisms revealed for rapid water disinfection by superabsorbent cryogels decorated with silver nanoparticles. *Environmental science & technology*, 49(4), 2310-2318.
- López-Moreno, M.L., De la Rosa, G., Hernández-Viezcás, J.Á., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videoa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2010). Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental science & technology*, 44(19), 7315-7320.

- Lu, W., Senapati, D., Wang, S., Tovmachenko, O., Singh, A.K., Yu, H., Ray, P. C. (2010). Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chemical physics letters*, 487(1-3), 92-96.
- Ma C, White., J, Dhankher., O, Xing.B (2015). Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environmental Science & Technology* 49: 7109-7122.
- Medina-Pérez, G., & Fernández-Luqueño, F. (2018). Nanotoxicidad: retos y oportunidades. Mundo Nano. *Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 11(20), 7-16. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.64105>
- Mehrian, S.K., Heidari, R., Rahmani, F. (2015). Efecto de las nanopartículas de plata sobre el contenido de aminoácidos libres y el sistema de defensa antioxidante de las plantas de tomate. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(3), 257-263.
- Mehta, C.M., Srivastava, R., Arora, S., Sharma, A.K (2016). Evaluación del impacto de las nanopartículas de plata en el crecimiento de las plantas y la diversidad bacteriana del suelo. *3 Biotech*, 6(2), 254.
- Méndez-Argüello, B., Lira-Saldívar, R.H., Ruíz-Torres, N.A., Cárdenas-Flores, A., Ponce-Zambrano, R., Vera-Reyes, I., De los Santos, G. (2015). Influencia de nanopartículas de óxido de zinc puras y dopadas con plata en el crecimiento y producción de biomasa en plántulas de chile. In *XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Guadalajara, Jalisco, México.
- Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I., Mendoza-Mendoza, E., García-Cerda, L.A., Puente-Urbina, B.A., Lira-Saldívar, R.H. (2016). Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annuum* por nanopartículas de óxido de zinc. *Nova scientia*, 8(17), 140-156.
- Mendoza Uribe, G., rodriguez-Lopez, J.L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles latinoamericanos*, 15, 161-186.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-*mimic* models. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4197-4220.

- Mhamdi, A., Van Breusegem, F. (2018). Especies reactivas de oxígeno en el desarrollo de las plantas. *Desarrollo*, 145(15), dev164376.
- Miller, G., Coutu, J., Shulaev, V. Mittler, R. (2018). Señalización reactiva de oxígeno en plantas. *Revisiones anuales de plantas en línea*, 189-201.
- Miralles, P., Church, T., Harris A (2012). Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environmental Science & Technology* 46: 9224-9239.
- Mohamed, A.K.S., Qayyum, M.F., Abdel-Hadi, A.M., Rehman, R.A., Ali, S. Rizwan, M. (2017). Efecto interactivo de la salinidad y las nanopartículas de plata sobre los parámetros fotosintéticos y bioquímicos del trigo. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(12), 1736-1747.
- Mohsenzadeh, S., Moosavian, S.S (2017). Efectos de sulfato de zinc y óxido de nano-zinc en algunos parámetros fisiológicos de *rosmarinus officinalis*. *American Journal of Plant Sciences*, 8(11), 2635.
- Moroto, J.V. (2002). Horticultura Herbacea Especial. 5a edición. Mundi- Prensa España. Pp 533-562.
- Mujeeb, M., Ismail, M.V., Aqil, M., Khan, A.H., Ikram, S., Ahmad, A. (2018). Evaluation of phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles on seed germination and growth of seedling of *Cassia occidentalis*. *The Pharma Innovation Journal*. 7(10): 08-12.
- Nair, P.M.G., Chung, I.M (2015). Estudios a nivel fisiológico y molecular sobre la toxicidad de las nanopartículas de plata en germinación de plántulas de frijol mungo (*Vigna radiata* L.). *Acta physiologiae plantarum*, 37(1), 1719.
- Nair, P.M.G., Chung, I.M. (2014). Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 112, 105-113.
- Núñez, V., del Carmen, L., Cornejo, T., Oliver, J. (2018). Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) con *Thelypteris glandulosolanosa* (Raqui-Raqui) y

evaluación de su efecto anticancerígeno en línea celular de Cáncer de Mama MCF-7.

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*. 102:083703-083707.

Ortega-Villasante, C., Burén, S., Blázquez-Castro, A., Barón-Sola, Á., Hernández, LE (2018). Imágenes fluorescentes in vivo de especies reactivas de oxígeno y potencial redox en plantas. *Radiología libre y medicina*, 122, 202-220.

Panwar, J., Jain, N., Bhargaya, A., Akhtar, M.S., Yun, Y.S. (2012). Positive effect of zinc oxide nanoparticles on tomato plants: A step towards developing nano-fertilizers. *In Proceedings of 3rd international conference on environmental research and technology (ICERT)* pp. 348-352.

Peralta. Pérez, M.del.R., Volke. Sepúlveda, T.L. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química* 11(1): 75-88.

Prasad, R., Gupta, N., Kumar, M., Kumar, V., Wang, S., AbdElsalam, K.A. (2017). Nanomaterials Act as Plant Defense Mechanism. *In Nanotechnology* (pp. 253-269).

Prasad, T.N.V.K.V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R. Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition* 35.6: 905-927.

Priyanka, N., Geetha, N., Ghorbanpour, M., Venkatachalam, P. (2019). Papel de las nanopartículas de óxido de cobre y zinc de ingeniería en la promoción del crecimiento y el rendimiento de las plantas: estado actual y perspectivas futuras. En avances en fitonanotecnología (pp. 183-201). *Prensa Académica*.

Puač, N., Škoro, N., Spasić, K., Živković, S., Milutinović, M., Malović, G., Petrović, Z. L. (2018). Activity of catalase enzyme in *Paulownia tomentosa* seeds during the

process of germination after treatments with low pressure plasma and plasma activated water. *Plasma Processes and Polymers*, 15(2), 1700082.

Pullagurala, V.L.R., Adisa, I.O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernández-Viezcas, JA, Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, JL (2018). Las nanopartículas de ZnO aumentan los pigmentos fotosintéticos y disminuyen la peroxidación lipídica en el cilantro (*Coriandrum sativum*) cultivado en el suelo. *Fisiología vegetal y bioquímica*, 132, 120-127.

Quispe Challco, C.R. (2010). Nanotecnología en la Agricultura. *Revista de información, tecnología y sociedad*, 72.

Raliya, R., Franke, C., Chavalmane, S., Nair, R., Reed N., Biswas P (2016). Quantitative understanding of nanoparticle uptake in watermelon plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1288-1295.

Raliya, R., Tarafdar J.C (2013) ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme J Mater Sci secretion and gum contents in cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Agricultural Research* 2:48–57

Raliya, R., Tarafdar, J.C. (2013). ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Agricultural Research*, 2(1), 48-57.

Ramesh, M., Palanisamy, K., Babu, K. Sharma, N.K. (2014). Effects of bulk and nano-titanium dioxide and zinc oxide on physio-morphological changes in *Triticum aestivum* Linn. *Journal of Global Biosciences*. 3(2):415-422.

Rao, S., Shekhawat, G.S (2014). Toxicidad de las nanopartículas diseñadas por ZnO y evaluación de su efecto sobre el crecimiento, el metabolismo y la acumulación específica de tejido en *Brassica juncea*. *Diario de Ingeniería Química Ambiental*, 2(1), 105-114.

Razzaq, A., Ammara, R., Jhanzab, H.M., Mahmood, T., Hafeez, A., Hussain, S. (2016). Journal of Nanoscience and Technology. *Journal of Nanoscience and Tecnology*. 2: 55-58.

Reddy Pullagurala, V.L., Adisa, I.O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernández-Viezcas, J.A., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2018). Las nanopartículas de ZnO aumentan los pigmentos fotosintéticos y disminuyen la peroxidación lipídica en el cilantro (*Coriandrum sativum*) cultivado en el suelo. *Fisiología Vegetal y Bioquímica*. doi: 10.1016 / j.plaphy.2018.08.037

Ricardo, H.L.S. (2016). Agronano Tecnología: Nueva frontera de la revolución verde.

Salama, H.M. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) and corn (*Zea mays L.*). *International Research Journal Biotechnology*, 3(10), 190-197.

Samreen, T., Shah, H.U., Ullah, S. Javid, M. (2017). Efecto de zinc sobre la tasa de crecimiento, clorofila, proteínas y contenidos minerales de la planta de frijol mungo cultivado hidropónicamente (*Vigna radiata*). *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1802-S1807.

Santana, Báez, S., Mendoza Martín, M., Quevedo Villegas, M.C., Gutiérrez Disla, E.J. (2018). Revisión Sistemática sobre los efectos tóxicos de las nanopartículas metálicas en la salud de los trabajadores. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 64(252), 295-311.

Sarabia Castillo, C.R., F. Fernández Luqueño. (2016). Efecto de nanopartículas sobre la simbiosis Rhizobia-leguminosa y morfológica de *Phaseolus vulgaris L.*, *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 3(2):122-132.

Scherer, M.D., Sposito, J.C., Falco, W.F., Grisolia, A.B., Andrade, L.H., Lima, S.M, Oliveira, S.L (2019). Efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de plata en las células meristemáticas de las raíces de *Allium cepa*: un análisis detallado de la dependencia del tamaño de partícula. *Science of The Total Environment*, 660, 459-467.

Schützendübel. A., Nikolova. P., Rudolf. C., Polle A. (2002). Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in *Populusx canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40(6), 577-584.

- Servin, A., Wade, E., Mukherjee, A., De la Torre, R., Hamdi, H., White, J., Bindranban, P., Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *De Journal Nanoparticle Research*. 17:92. 21-25.
- Servin, A.D., White, J.C. (2016). Nanotechnology in Agriculture: Next Steps for Understanding Engineered Nanoparticle Exposure and Risk. *Nano Impact*. 1:9-12.
- Shalaby, T.A., Bayoumi, Y., Abdalla, N., Taha, H. (2016). Nanoparticles, solils, plants and sustainable agriculture. *In Nanoscience in Food and Agriculture I* (Vol.20). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39303-3>.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M.G.H., Saradhi, P.P., Khanna, P.K Arora, S. (2012). Mejora mediada por nanopartículas de plata en el crecimiento y el estado antioxidante de *Brassica juncea*. *Bioquímica aplicada y biotecnología*, 167(8), 2225-2233.
- Silva, E.N., Silveira, J.A., Aragão, R.M., Vieira, C.F., Carvalho, F.E (2019). El deterioro de la fotosíntesis y el estrés oxidativo en *Jatropha curcas* expuestas a la sequía dependen en parte de la disminución de la actividad catalasa. *Acta physiologiae plantarum*, 41(1), 4.
- Solanki, P., Bhargava, A., Chhipa, H., Jain, N., Panwar. J. (2015). Nanofertilizers and their Smart delivery system. *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. 81-101.
- Somasundaran, P., Fang, X., Ponnurangam, S., Li, B. (2010). Nanoparticles: Characteristics, Mechanisms and Modulation of Biototoxicity. *Kona Powder and Particle* 28: 38-49.
- Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., Lee, E.J (2013). Análisis funcionales de la toxicidad de nanopartículas: un estudio comparativo de los efectos de TiO<sub>2</sub> y Ag en tomates (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicología y seguridad ambiental*, 93, 60-67.
- Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., Colbeck, I. (2016). Las nanopartículas de plata diseñadas se detectan en la membrana

plasmática y modifican drásticamente la fisiología de las plantas de *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 85(2), 245-257.

Srilatha, B. (2011). Nanotechnology in agriculture. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 2(7).

Srivastava S., Srivastava M. (2014). Morphological changes and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* under water stress. *American Journal of Plant Sciences*. 5(22), 3417-3422.

Syu, Y.Y., Hung, J.H., Chen, J.C., Chuang, H.W. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant physiology and biochemistry*, 83, 57-64.

Szepesi, Á. Szöllősi, R. (2018). Mecanismo de la biosíntesis de prolina y papel de las enzimas del metabolismo de la prolina bajo estrés ambiental en plantas. En *Metabolitos de plantas y regulación bajo estrés ambiental* (pp. 337-353). *Prensa Académica*

Tarafdar J.C., Raliya R., Mahawar H., Rathore I (2014) Desarrollo de nanofertilizante de zinc para mejorar la producción de cultivos en mijo perla (*Pennisetum americanum*). *Agriculture Res* 3(3): 257–262

Thuesombat, P., Hannongbua, S., Akasit, S. Chadchawan, S. (2014). Efecto de las nanopartículas de plata sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de arroz (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105). *Ecotoxicología y seguridad ambiental*, 104, 302-309.

Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P.K., Singh, V.P., Singh, S. Chauhan, D.K. (2017). Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 167-177.

Vahtmäe, E., Kotta, J., Orav-Kotta, H., Kotta, I., Pärnoja, M. Kutser, T. (2018). Predicción de pigmentos de macroalgas (clorofila a, clorofila b, clorofila a + b, carotenoides) en diversas condiciones ambientales utilizando espectroradiómetros hiperespectrales de alta resolución. *Revista internacional de teledetección*, 39(17), 5716-5738.

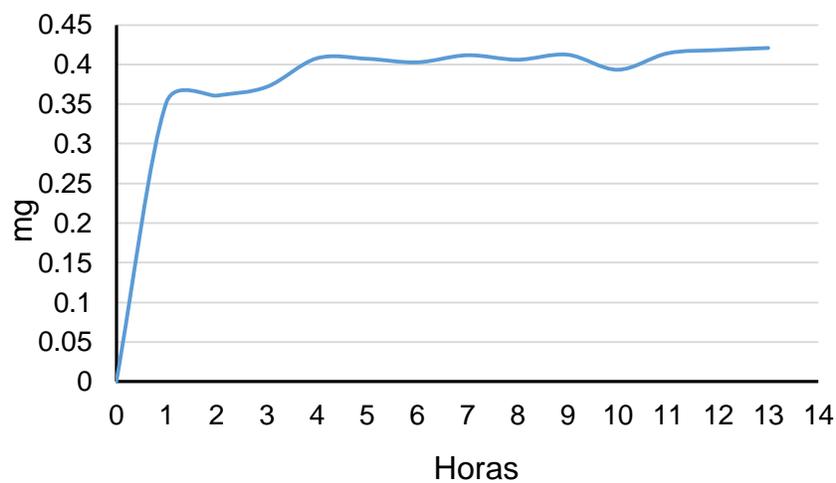
- Varga, M., Horvatić, J., Barišić, L., Lončarić, Z., Dutour Sikirić, M., Erceg, I., Štolfa Čamagajevac, I. (2018). Efecto fisiológico y bioquímico de la plata en la planta acuática *Lemna gibba* L evaluación de producto disponible comercialmente que contiene plata coloidal. *Toxicología acuática*. doi: 10.1016 / j.aquatox.2018.11.018
- Venkatachalam, P., Jayaraj, M., Manikandan, R., Geetha, N., Rene, E.R., Sharma, N.C., Sahi, S.V. (2017). Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) alleviate heavy metal-induced toxicity in *Leucaena leucocephala* seedlings: a physiochemical analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 59-69.
- Venkatachalam, P., Priyanka, N., Manikandan, K., Ganeshbabu, I., Indiraarulsevi, P., Geetha, N., Sahi, S.V (2017). Mejora de la función promotora del crecimiento de las plantas de nanopartículas de óxido de zinc recubiertas con fitomoléculas con suplementación de P en algodón (*Gossypium hirsutum* L.) *Fisiología y bioquímica de plantas*, 110, 118-127.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Sharma, S. (2017). Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) on *Brassica* sp. *Frontiers in plant science*, 8, 1501.
- Waszczak, C., Carmody, M., Kangasjärvi, J. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual review of plant biology*, 69, 209-236.
- Wen, Y., Zhang, L., Chen, Z., Sheng, X., Qiu, J., Xu, D. (2016). Co-exposure of silver nanoparticles and chiral herbicide imazethapyr to *Arabidopsis thaliana*: enantioselective effects. *Chemosphere*, 145, 207-214.
- Záyago–Lau, E., Foladori, G. (2010). La Nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Revista Scielo. Economía, sociedad y desarrollo* 10(32).
- Zhang, C., Hu, Z., Deng, B. (2016). Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water research*, 88, 403-427.

Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2016). Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Frontiers in plant science*, 7, 90.

Zuverza-Mena, N., Martinez-Fernandez, D., Du, W., Hernandez-Viezcas, J.A., Bonilla-Bird, N., Lopez-Moreno, M.L., Gardea-Torresdey, J.L. (2017). Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses- A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 236-264.

## 6. ANEXOS

### Anexo 1. Curva de imbibición.



### Anexo 2. Curva de calibración de proteína.

