

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Aplicación de Nanopartículas de Cobre en Hidrogeles de Quitosán para Promover la Tolerancia al Estrés Salino en Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Por:

**GUADALUPE MAGDALENO GARCÍA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Junio 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Aplicación de Nanopartículas de Cobre en Hidrogeles de Quitosán para Promover la Tolerancia al Estrés Salino en Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Por:

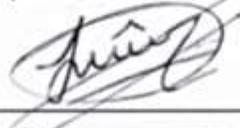
**GUADALUPE MAGDALENO GARCÍA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Antonio Juárez Maldonado

Asesor Principal



Dra. Susana González Morales

Coasesor



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador

Coasesor



Dr. Gabriel Callegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Junio 2017

## DEDICATORIAS

### A Dios:

Por permitirme llegar a este momento de mi vida, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mi familia:

### A mis padres:

A mi madre la **Sra. Betzabeth García Laguna**, por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por ser el ejemplo para seguir adelante y por sus consejos que han sido de gran ayuda.

A mi padre el **Sr. Luis Magdaleno Serrano** gracias por haber confiado en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida profesional.

### A mis abuelos

**Sra. Guadalupe Serrano** que con la sabiduría de Dios me ha enseñado a ser quien soy hoy, gracias por el apoyo y amor incondicional.

**Sra. Eva Laguna y Sr. Melchor García**, que siempre estuvieron a mi lado con una palabra animadora y por ser una guía para cumplir mis objetivos.

A mis hermanos **Luis, Manuel e Isaac** y de más familia en general por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi carrera universitaria, especialmente a **Paloma** por ser como una hermana mayor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, por haberme dado la oportunidad de formarme como profesionista y todo el apoyo que me brindo durante mi formación académica.

Al **Dr. Antonio Juárez Maldonado** por compartir sus conocimientos, por su paciencia, consejos y asesoría para concluir y desarrollar la tesis.

A la **Dra. Susana González Morales** por sus valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo.

A la **Dra. Silvia Yudith Martínez Amador** por asesorarme para forjar mis conocimientos con las mejores bases.

Al **M.C. Hipólito Hernández Hernández**, por sus conocimientos, sus orientaciones y comprensión, así como el tiempo dedicado para culminar este proyecto.

A la **Dra. Nayelli Marsh Martínez** por permitirme culminar mis prácticas profesionales, por enseñarme a trabajar en equipo e impulsarme a seguir adelante.

A todos mis amigos y compañeros de carrera: Manuel, Fátima, Magui, Blanca, Hugo, Fernando, Diana, Kimberly, Fernanda, julio, Cesar, Lorenzo, itxayana, Maye, Xitla, Aby, Alexis, Mayra, Laura, Hilary, Patricio, Rene, Karina y especialmente, Barby, Francisco, Yoselín y Rodrigo que me apoyo en todo momento.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	4
Objetivo general .....	4
Objetivos específicos.....	4
<b>HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
Cultivo del tomate.....	5
Origen del tomate.....	5
Ubicación taxonómica .....	5
Nanotecnología.....	6
Nanomateriales y nanopartículas .....	6
Usos de las nanopartículas .....	8
Uso de las nanopartículas en la Agricultura .....	8
Nanopartículas metálicas en plantas .....	10
Estrés salino en plantas .....	14
Estrés oxidativo y antioxidantes.....	15
Aplicación de nanopartículas de cobre en plantas .....	19
Quitosán e hidrogeles de quitosán.....	22
Aplicaciones de las nanopartículas en hidrogeles de quitosán en la agricultura.....	23
<b>METODOLOGÍA</b> .....	25
Etapas y localización .....	25
Variables evaluadas.....	28
Diseño experimental.....	33
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	33
Variables agronómicas.....	33
Variables de pigmentos de las hojas .....	37

Variables de calidad del fruto .....	38
Variables de compuestos antioxidantes .....	41
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>44</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Variables agronómicas del cultivo de tomate aplicando nanopartículas de cobre (nCu) + quitosan (Cs) bajo condiciones de estrés salino.....	36
<b>Tabla 2.</b> Variables de pigmentos de la hoja del cultivo de tomate aplicando nanopartículas de cobre (nCu) + quitosan (Cs) bajo condiciones de estrés salino.....	38
<b>Tabla 3.</b> Variables relacionadas a la calidad de fruto de tomate tratado con nanopartículas de cobre + quitosán bajo estrés salino.....	40
<b>Tabla 4.</b> Contenido de compuestos antioxidantes en hojas y frutos de tomate tratado con hidrogeles de quitosán-nCu bajo condiciones de estrés salino.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efecto de nanopartículas de cobre (nCu) + quitosán (Cs) en la variable rendimiento en plantas de tomate bajo estrés salino.....	35
<b>Figura 2.</b> Efecto de quitosán (Cs) y nanopartículas de cobre (nCu) en la vitamina C de fruto de tomate bajo condiciones de estrés salino.....	41

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Saltillo, Coahuila. Se desarrolló un cultivo de tomate híbrido de crecimiento indeterminado var. Huro F1 en invernadero, con el objetivo de evaluar el efecto de las nanopartículas de cobre absorbidas en hidrogeles de quitosán-PVA en plantas de tomate bajo condiciones de estrés salino (NaCl). Se aplicaron al sustrato nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán (nCu) (tratamiento 1), hidrogel de quitosán-PVA (Cs) (tratamiento 2) y un testigo absoluto. Se evaluaron variables agronómicas, calidad de fruto, pigmentos de la hoja y compuestos antioxidantes de fruto y hoja. Se usó un diseño estadístico completamente al azar. Para las variables agronómicas se utilizaron 16 repeticiones por tratamiento. En el resto de las variables se consideraron 5 repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias LSD ( $p \leq 0.05$ ). En los resultados, la aplicación de nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán-PVA tuvo un efecto positivo en el rendimiento de las plantas de tomate sometidas a estrés salino, se observó un incremento del 9% en relación con el testigo. El quitosán mostró un efecto promotor en la altura de las plantas. La producción de vitamina C mejoró con la aplicación tanto de nanopartículas de cobre como de quitosán, incremento entre un 33 a 42% respectivamente, de igual manera el pH. La aplicación de quitosán aumentó el contenido de clorofilas. Se incrementó el contenido de fenoles y la actividad del glutatión en hoja por los tratamientos de nanopartículas de cobre y quitosán. Se demostró que la aplicación de nanopartículas de cobre en

hidrogeles de quitosán tiene efectos positivos en la tolerancia al estrés salino por plantas de tomate.

**Palabras clave:** nanopartículas, cobre, quitosán, hidrogeles, salinidad, tomate.

## INTRODUCCIÓN

La nanotecnología (NT) es una ciencia multidisciplinaria que se basa en el estudio y desarrollo de sistemas en escala muy pequeña, tamaño “nano” o equivalente a una mil millonésima parte de un metro ( $10^{-9}$  m). Los científicos usan partículas de tamaño minúsculo llamadas nanopartículas (NPs) con dimensiones entre 10 y 100 nanómetros (Auffan *et al.*, 2009). Estas poseen propiedades físicas y químicas absolutamente únicas y diferentes a las partículas más grandes (Misra *et al.*, 2013). Las nanopartículas en plantas se aplican en forma foliar (Hong *et al.*, 2015), hidroponía (López *et al.*, 2016), *in vitro* (Nair y Chung, 2015) y en sustrato (Juárez-Maldonado *et al.*, 2015). Cuando se aplican en el sustrato éstas penetran a través de la raíz, se mueven con la corriente de transpiración en los vasos del xilema y se transportan a la parte aérea de las plantas (Cifuentes *et al.*, 2010).

Nair y Chung (2015) informaron que las nanopartículas de óxido de cobre (NPs CuO) aumentan la actividad de superóxido dismutasa y disminuyen la actividad ascorbato peroxidasa en raíces de *Brassica juncea* L. (mostaza de la India). Trujillo *et al.* (2014), mencionan que al aplicar 10 mg/L de nanocobre (nCu) se incrementó la actividad de catalasa, y al aplicar 20 mg/L de nCu disminuyó la actividad de ascorbato peroxidasa en hojas de lechuga (*Lactuca Sativa*).

Juárez-Maldonado *et al.* (2015), realizaron una investigación en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) donde se usó una concentración de 0.06 g L<sup>-1</sup> de (nCu)

absorbido en hidrogeles de quitosán, en cuanto a los antioxidantes se observaron diferencias estadísticas en la actividad enzimática de catalasa en las hojas y en el contenido de licopeno en fruto.

Por otro lado, Karami *et al.* (2015), evaluaron el efecto de las NPs de Ag en plantas de tomate y obtuvieron los mejores resultados 75 y 100 mg/L, concluyendo que las enzimas antioxidantes modulan el estrés oxidativo inducido por las NPs de Ag en plantas de tomate.

El estrés salino en plantas de tomate provoca un sinnúmero de efectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, tales como disminución del rendimiento y fotosíntesis, menor peso de los frutos, cambios cuantitativos y cualitativos en la síntesis de proteínas y cambios en la expresión de genes, entre otros (Amini *et al.*, 2007)

Los antioxidantes en las plantas generalmente están ligados a la capacidad de tolerar estrés oxidativo, la aplicación de NPs de Cu resulta en una mayor generación de antioxidantes, así la planta tendrá mayor capacidad de tolerar algún tipo de estrés ya sea biótico y/o abiótico. Los compuestos generalmente asociados con la capacidad antioxidante son: la catalasa, peroxidasa, ácido salicílico, vitamina C y vitamina E (Da-Costa y Sharma, 2015).

El interés por mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad ha incrementado en los últimos años y se han generado nuevas alternativas de producción basados en la nanotecnología, es necesario difundir información del efecto de las nanopartículas sobre los cultivos, ya que se ha descubierto que la aplicación de

las nanopartículas metálicas induce efectos positivos en diversos cultivos. Por lo anterior, en este trabajo se evaluaron plantas de tomate tratadas con nanopartículas de cobre absorbidas en hidrogeles de quitosán-PVA, las cuales fueron sometidas a estrés salino para conocer su tolerancia y generar conocimiento en la comprensión de los mecanismos de defensa de las plantas de tomate.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar si la aplicación de las nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán-PVA aumenta la capacidad para tolerar el estrés salino en plantas de tomate.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate bajo estrés salino.
- Evaluar los pigmentos de la hoja para conocer los cambios derivados con la aplicación de las nanopartículas de cobre y el quitosán.
- Evaluar la calidad del fruto de plantas de tomate bajo estrés salino para conocer los cambios asociados a la calidad nutracéutica derivada de la aplicación de las NPs de Cu.
- Evaluar el contenido de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en plantas de tomate bajo estrés salino.

## **HIPÓTESIS**

Las NPs Cu en hidrogeles de quitosán-PVA aumentan la tolerancia al estrés salino en plantas de tomate.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## **Cultivo del tomate**

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se considera como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, por el gran número de productos que se obtienen. Mundialmente ocupa el segundo lugar en importancia entre las hortalizas debido a su nivel de producción, la cual es superada solamente por el cultivo de la papa. De igual manera se considera la segunda hortaliza más consumida ya que proporciona importantes fuentes de vitaminas A y C, minerales esenciales, antioxidantes fenólicos y otros nutrientes (kalia y palanisamy, 2013; SAGARPA, 2005).

## **Origen del tomate**

El tomate, y las plantas más relacionados con él, tienen su centro de origen en una región montañosa, estrecha y alargada de los Andes en Perú, Ecuador y Chile. Además, algunas plantas claramente emparentadas con el tomate cultivado son parte de la flora nativa de las islas Galápagos (Jenkins, 1948).

## **Ubicación taxonómica**

El tomate pertenece a la familia de las solanáceas, junto con otros cultivos de importancia económica como el pimiento, berenjena y la papa. Fue clasificado por Miller (1754) como *Lycopersicum esculentum* y renombrado por Child (1990) y Peralta y Spooner (2006) como *Solanum lycopersicum* (Diez y Nuez, 2008), sin embargo y con objeto de evitar más confusión en la nomenclatura, muchos

sistemáticos para denominar al tomate cultivado han propuesto la adopción de la prolongadamente utilizada nomenclatura de *Solanum lycopersicum*.

## **Nanotecnología**

La nanotecnología (NT) se define como un campo de las ciencias aplicadas dedicadas al control y manipulación de la materia a una escala de 1 a 100 nanómetros de tamaño donde se presentan propiedades químicas y físicas únicas (Dawson, 2008). Hace referencia a la integración de diferentes disciplinas científicas capaces de crear y desarrollar nuevos materiales, aplicaciones entre ellas la industria del agro (Ghormade *et al.*, 2011).

La NT trabaja claramente con materiales estructurados en escala nanométricas o ya sea nanoestructuras. La aparición de la NT y el desarrollo de nuevos nano dispositivos y nanomateriales abren nuevas aplicaciones potenciales en la agricultura y la biotecnología, representa una de las innovaciones científicas, y en muchos sentidos, la de mayor alcance en lo referente a la alta tecnología para la agricultura y los alimentos frescos (Gruere, 2012)

## **Nanomateriales y nanopartículas**

Según Fages (2013), los nanomateriales se pueden clasificar conforme a su naturaleza química en cuatro grandes familias:

- Nanomateriales derivados del silicio: nanoarcillas, nanoesferas de sílice, nanoesferas de silicio y nanocompuestos de tipo oligomérico poliédrico silsesquioxano (POSS).

- Nanomateriales derivados del carbono: fullerenos, nanotubos y nanofibras de carbono.
- Nanopartículas metálicas y derivados de estas: plata, oro, cobre, titanio, zinc, dióxido de titanio, óxido de zinc, cerio, etc.
- Nanopartículas poliméricas: dendrímeros

Las nanopartículas son materiales que son lo suficientemente pequeños como para caer dentro del rango nanométrico ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  m), teniendo sus dimensiones de menos de unos pocos cientos de nanómetros (Srilatha, 2011).

Dentro de las NPs se encuentran las nanopartículas metálicas que tienen la capacidad potencial de viajar en el interior del organismo que otros materiales o partículas más grandes no pueden hacer, por lo tanto, se pueden evaluar diversas interacciones de las NPs con fluidos, células y tejidos (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

Por esta razón Ferrer (2012) menciona que las nanopartículas metálicas presentan una gran aplicabilidad debido a sus propiedades electrónicas. Estos pequeños agregados metálicos no pueden ser tratados como el grueso del material, ya que la banda de conducción presente en un metal voluminoso está ausente en este tipo de sistemas, y en su lugar se darán estados discretos en la banda. Los electrones están confinados en pequeñas partículas de metal, mostrando así las propiedades de los "puntos cuánticos". Se utiliza la palabra cuántico para enfatizar que las nanopartículas metálicas que muestran una serie de propiedades ópticas y electrónicas inesperadas, resultado del confinamiento

de los electrones a un número finito de estados energéticos cuánticos disponibles.

### **Usos de las nanopartículas**

El uso de nanopartículas es muy diferente en la agricultura, industria y medicina (Kim *et al.*, 2004). Las nanopartículas son ampliamente utilizadas en productos farmacéuticos, cosméticos, alimentos, textiles, técnicas de imagen para diagnosticar trastornos médicos y materiales. En la agricultura, su uso está aumentando de manera exponencial debido a las propiedades mecánicas, electrónicas y químicas que éstas poseen (Somasundaran *et al.*, 2010).

En la industria alimentaria el uso principal de las NPs se debe a su actividad antimicrobiana, por ejemplo, el dióxido de titanio, es un colorante alimentario que puede utilizarse como barrera de protección en el envasado de alimentos o las NPs de plata que, utilizadas como agentes antimicrobianos en los paneles de los refrigeradores y frigoríficos, así como en los recipientes de almacenamiento, líneas de envasado y otras superficies destinadas a entrar en contacto con los alimentos. Las NPs orgánicas se emplean principalmente para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, utilizándose como vehículo para la liberación de vitaminas y otros nutrientes incorporados en nanocápsulas (Zhang *et al.*, 2006).

### **Uso de las nanopartículas en la Agricultura**

La agricultura es un área donde las nuevas tecnologías se aplican para mejorar el rendimiento de los cultivos. El uso de las NPs puede tener soluciones concretas contra muchos de los problemas relacionados con la agricultura como

el control de plagas de insectos utilizando los métodos tradicionales, los efectos adversos que provocan las sustancias químicas que contienen los pesticidas y la transferencia de genes mediada por NPs que sería útil para el desarrollo de variedades mejoradas en cultivos resistentes a plagas de insectos, etc. (Azeredo *et al.*, 2009).

En la agricultura su uso incluye los fertilizantes para aumentar el crecimiento y rendimiento de la planta, pesticidas para combatir las plagas y enfermedades, sensores para monitorear la calidad del suelo y la sanidad de las plantas. Durante la última década se han desarrollado una serie de patentes y productos que incorporan nanomateriales en prácticas agrícolas (por ejemplo, nanopesticidas, nanofertilizantes y nanosensores). Las metas colectivas de todos estos enfoques es mejorar la eficiencia y la sostenibilidad de las prácticas agrícolas al requerir menos recursos y generar menos residuos indeseados que los productos convencionales (Servin *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2010).

Se elaboran NPs y polímeros o biomacromoléculas específicas que son de interés significativo, ya que las NPs pueden ser utilizadas como aditivos de películas plásticas para bioespacios en la agricultura protegida y en antimicrobiales de toxinas, bacterias y hongos (Adner *et al.*, 2013). Es decir, las NPs son factibles para la fabricación de productos poliméricos incluyendo películas y posiblemente acolchados para suelos, túneles, microtúneles e invernaderos.

El uso de las nanopartículas mejora los productos químicos agrícolas de liberalización controlada *in situ* con el objetivo de transferir moléculas para dar resistencia a enfermedades (Agrawal y Rathore, 2014).

### **Nanopartículas metálicas en plantas**

De los efectos de las nanopartículas metálicas en plantas se reporta un mayor porcentaje de germinación, tasa de crecimiento, biomasa de raíz y brotes y aumento en parámetros fisiológicos como las actividades fotosintéticas y metabolismo del nitrógeno en muchos cultivos (Moghadam *et al.*, 2015).

Adhikari *et al.* (2013), realizaron un estudio en el que se evaluó el impacto de las nano partículas de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) y molibdeno (Mo) en la germinación de semilla de arroz (*Oryza sativa* L.). Se evaluaron los efectos potenciales de  $\text{SiO}_2$  (10-20 nm) y Mo (<100 nm) y se observó una buena germinación de semillas, en el tratamiento con nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  no se mostró ningún efecto tóxico sobre el crecimiento del arroz, mientras que en el tratamiento con nano partículas de Mo después de 50 mg/L el crecimiento y elongación de la raíz fueron detenidos.

Por otro lado, un estudio realizado por Siddiqui y Al-Whaibi (2014), el cual se llevó a cabo para poner a prueba los efectos de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  de un tamaño 12 nm sobre la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Se observó que el tratamiento de 8 mg/L de  $\text{nSiO}_2$  mejoró el porcentaje de germinación de la semilla, tiempo de germinación, índice de germinación de las semillas, el índice de vigor de las semillas, peso fresco y peso seco. Por lo tanto,

es muy claro que el nano SiO<sub>2</sub> tiene un impacto significativo en el potencial de germinación de las semillas y características de las plantas de tomate.

Lin y Xing (2007) llevaron a cabo una investigación en la que se evaluaron los efectos de cinco tipos de nanopartículas (nanotubos de carbono, aluminio, alúmina, zinc y óxido de zinc) sobre la germinación de semillas y crecimiento de las raíces de las seis especies de plantas superiores rábano (*Raphanus sativus*), zanahoria (*Brassica napus*), raigrás (*Lolium Perenne*), lechuga (*Lactuca sativa*), maíz (*Zea mays*) y pepino (*Cucumis sativus*). Se menciona que la germinación de las semillas no se vio afectada, excepto en el tratamiento con zinc a nanoescala (nano-Zn) en raigrás y óxido de zinc (nano-ZnO) en el maíz en 2000 mg/L. La inhibición de crecimiento de las raíces varió mucho entre las nanopartículas y las plantas.

Por su parte Hojjat y Hojjat (2015) realizaron una investigación donde se evaluó el efecto de las nanopartículas de plata sobre la germinación y crecimiento de plántulas de alholva (*Trigonella foenum-graecum*), se manejaron parámetros de crecimiento de la planta como la longitud de la raíz, peso fresco, peso seco y porcentaje de germinación, utilizando cinco concentraciones de nanopartículas de plata (0, 10, 20, 30 y 40 µg/ml). Los resultados de germinación de semillas indican que las nanopartículas de plata en bajas concentraciones promovieron la germinación y crecimiento temprano de plántulas de alholva, sin embargo, en una concentración más alta mostraron efectos adversos leves. Además, hubo una importante influencia positiva en la longitud de raíz, peso fresco de raíz y elongación de raíz para todas las semillas en comparación con el testigo. Los

resultados mostraron que el efecto de las nanopartículas de plata fue significativo en el porcentaje de germinación.

López *et al.* (2010), llevaron a cabo un estudio en semillas de alfalfa (*Medicago sativa*), maíz (*Zea mays*), pepino (*Cucumis sativus*), y el tomate (*Solanum lycopersicum*) tratadas con nanocerio en 0-4000 mg/L, Los resultados mostraron que el nanocerio redujo significativamente la germinación de maíz (alrededor de 30% a 2000 mg/L y en tomate y pepino se redujo en 30 y 20% respectivamente. El crecimiento de las raíces fue promovido de forma significativa por el nanocerio en el pepino y maíz, pero se redujo en alfalfa y tomate. Además, en casi todas las concentraciones, el nanocerio promovió la elongación de los brotes en las cuatro especies de plantas.

Por otro lado, López *et al.* (2016), llevaron a cabo un trabajo experimental para explorar la tolerancia de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) a las nanopartículas de cobalto ferrita ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ). Las plantas de tomate fueron cultivadas en medios hidropónicos con nanopartículas de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  en un rango de 0 a 1000 mg/L. La exposición a NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  no afectó la germinación y el crecimiento de las plantas, pero se aumentó la absorción de Fe y Co dentro de los tejidos vegetales con el aumento de la concentración de nanopartículas. La absorción de Mg en las hojas de la planta alcanzó su máximo nivel a una concentración de 4.9 mg/L, el mayor peso seco se registró a una concentración de 125 mg/L y hubo una disminución en altas concentraciones de NPs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

Lee *et al.* (2010), desarrollaron un estudio para evaluar los efectos de las nanopartículas de óxido de aluminio ( $\text{nAl}_2\text{O}_3$ ), óxido de silicio ( $\text{nSiO}_2$ ), magnetita ( $\text{nFe}_3\text{O}_4$ ), y óxido de zinc ( $\text{nZnO}$ ), en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (berro

de oreja de ratón). Bajo tres indicadores de toxicidad (germinación de la semilla, alargamiento de la raíz, y el número de hojas) se cuantificó la exposición a cada nanopartícula a tres concentraciones: 400, 2.000, y 4.000 mg/L. Entre estas partículas, nZnO era más fitotóxico, seguido de nFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, nSiO<sub>2</sub>, y nAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que no era tóxico.

Por su parte Peralta *et al.* (2014), realizaron una investigación en la cual el objetivo fue determinar los elementos nutricionales en soja (*Glycine max*), cultivadas en suelo agrícola modificado con nanopartículas de CeO<sub>2</sub> a una concentración de 0-1000 mg/kg y ZnO de 0-500 mg/kg. En comparación con el control, las vainas de nCeO<sub>2</sub> a 1000 mg/kg tuvieron significativamente menos Ca pero más P y Cu, mientras que las vainas de 100 mg/kg de nZnO tuvieron más Zn, Mn y Cu. Los datos de esta investigación sugieren que nCeO<sub>2</sub> y nZnO alteran el valor nutricional de la soja.

Prasad *et al.* (2012), realizaron un experimento con semillas de cacahuate que fueron tratadas por separado con diferentes concentraciones de óxido de zinc a nanoescala (ZnO) y suspensiones de quelatos de sulfato de zinc a granel (ZnSO<sub>4</sub>), respectivamente, se estudió el efecto sobre la germinación de semillas, vigor de las plántulas, crecimiento de las plantas, la floración, el contenido de clorofila, rendimiento de vainas y el crecimiento de las raíces. Los tratamientos con nanopartículas de ZnO de 25 a 1000 ppm de concentración promovieron tanto la germinación como el vigor de las plántulas y a su vez mostraron pronto establecimiento en el suelo que se manifestó por la floración temprana y mayor contenido de clorofila en las hojas. Estas partículas han demostrado su eficacia

en el aumento de crecimiento del tallo y la raíz. El rendimiento de vainas por planta fue 34% mayor en comparación con el tratamiento  $ZnSO_4$ . El experimento se llevó a cabo en campo con aplicación foliar.

### **Estrés salino en plantas**

La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos porque reduce el potencial hídrico de la solución del suelo, por lo que disminuye la disponibilidad de agua, y crea un desequilibrio nutritivo, dada la elevada concentración de elementos ( $Na^+$ ,  $Cl^-$ ) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular (Amini *et al.*, 2007). En consecuencia, los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento, hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado del estrés hídrico, la toxicidad iónica y el desequilibrio nutricional (Parida y Das, 2005). La salinidad afecta la fotosíntesis, principalmente a través de la reducción del área foliar, el contenido de clorofila y la conductancia estomática, y en menor extensión a través de una disminución de la eficiencia del fotosistema II (Chinnusamy *et al.*, 2005). Los efectos adversos de la salinidad pueden atribuirse al efecto del estrés salino sobre el ciclo celular y la diferenciación. La salinidad detiene temporalmente el ciclo celular reduciendo la expresión y actividad de ciclinas y proteínas quinasa dependientes de ciclinas, lo que trae como resultado menos células en los meristemas, y un crecimiento limitado.

Gossett *et al.* (1994), evaluaron el efecto de  $NaCl$  en diferentes variedades de algodón, para determinar el nivel de tolerancia a la sal y se determinó que las

variedades con más tolerancia fueron aquellas que presentaron una mayor actividad de las enzimas catalasa, peroxidasa, glutatión reductasa, los datos indican que la protección contra el daño oxidativo está dada por niveles más altos de antioxidantes sugiriendo que puede estar implicado en el desarrollo de la tolerancia a sal en el algodón.

### **Estrés oxidativo y antioxidantes**

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación que llamamos reducción. Esta oxidación es fundamental para la vida, pues participa en los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo, cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo, que es una realidad compleja en todos los niveles biológicos, que no se puede medir ni definir con un solo parámetro. Hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres. Por esto, terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo (Elejalde, 2001).

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los

radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente -membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venereo, 2002).

Da-Costa y Sharma (2015), analizaron el efecto de las nanopartículas de óxido de cobre (II) (NPs CuO) en el crecimiento, la fotosíntesis y la respuesta antioxidante de arroz (*Oryza sativa* var. Jyoti). Los resultados fueron que la tasa de germinación, la longitud de la raíz y la biomasa disminuyeron, mientras que la absorción de Cu en las raíces y brotes aumentó a altas concentraciones de NPs de CuO. La tasa fotosintética, la tasa de transpiración, conductancia estomática y contenido de pigmentos fotosintéticos disminuyeron a 1000 mg/L de nanopartículas de óxido de cobre, también se observó la expresión elevada de ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa, enzimas que forman parte de los compuestos antioxidantes.

Nekrasova *et al.* (2011) estudiaron los efectos de los iones de cobre (II) y nanopartículas de óxido de cobre en *Elodea densa* (Planch), en la tasa de peroxidación de lípidos, las actividades de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa), y la fotosíntesis. Los resultados mostraron que las nanopartículas activan la peroxidación lipídica y aumentan las actividades de la catalasa y superóxido dismutasa en las plantas tratadas a una concentración de 1.5 a 2.0 mg/L.

Rao y Shekhawat (2014) llevaron a cabo un estudio donde evaluaron los efectos del óxido de zinc (ZnO) en el crecimiento de las plantas, la acumulación y la actividad enzimática antioxidante en *Brassica juncea*. La semilla se germinó en

condiciones hidropónicas con una concentración variable de ZnO (0, 200, 500, 1000, 1500 mg/L) durante 96 h. La disminución significativa en la biomasa de las plantas se registró con un incremento gradual en el contenido de prolina y la peroxidación lipídica hasta una concentración de 1000 mg/L. La estimación de la enzima antioxidante catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y la superóxido dismutasa (SOD) se llevó a cabo en diferentes tejidos de la planta. Además, también se registró la acumulación de nanopartículas de óxido de zinc en los tejidos. Se concluyó que las nanopartículas de óxido de zinc causaron la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los tejidos vegetales.

Corral *et al.* (2014), llevaron a cabo una investigación para determinar el impacto de nanopartículas de óxido de cerio ( $n\text{CeO}_2$ ) en rábano (*Raphanus sativus* L.). Las plantas se cultivaron en macetas con suelo tratado con  $n\text{CeO}_2$  a concentraciones de 0, 62.5, 125, 250, y 500 mg/kg y se evaluó la germinación, crecimiento, la fotosíntesis y antioxidantes en diferentes etapas de crecimiento. Los resultados mostraron que a 500 mg/kg, de  $n\text{CeO}_2$  retardó significativamente la germinación de las semillas, pero no redujo el número de semillas germinadas. En ninguno de los tratamientos se afectó el intercambio de gases, la fotosíntesis, el crecimiento, fenoles, flavonoides, y la acumulación de nutrientes en los tubérculos y hojas de plantas adultas. La evaluación de la capacidad antioxidante en tubérculos se determinó con diferentes metodologías: fenoles totales, FRAP (ferric reducing-antioxidant power), ABTS (2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) y DPPH (1,1-difenil2-picrilhidracil), aumentando en un 30%, 32% y

85%, respectivamente, en las plantas tratadas con 250 mg nCeO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de suelo. Además, la acumulación de cerio en tubérculos de plantas tratadas con 250 y 500 mg/kg alcanzó 72 y 142 mg/kg en peso, respectivamente.

Otra investigación realizada por Faisal *et al.* (2013), en la cual se examinaron nanopartículas de óxido de níquel (NPsNiO) en el intervalo de concentración de 0.025-2.0 mg/ml para la inducción de estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, apoptosis / necrosis en las raíces de plántulas de tomate, como un modelo in vivo para la evaluación de nanotoxicidad en las plantas. En comparación con el testigo, la catalasa (CAT), el glutatión (GSH), superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidación lipídica (LPO) en 2,0 mg/ml, los tratamientos con NPs de NiO mostraron 6.8, 3.7, 1.7 y 2.6 veces mayores actividades de enzimas antioxidantes. A 2.0 mg/ml se presentó aumento de las especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS) y potencial de membrana mitocondrial de raíces de las plántulas lo que confirmaron el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

Por otro lado, Canivet *et al.* (2015), realizaron una investigación en la cual se utilizaron nanopartículas de hierro (NPsFe) para evaluar los efectos de citotoxicidad, el estrés oxidativo, la peroxidación de lípidos de membrana, en el cultivo musgo *Physcomitrella patens* expuesto a cinco concentraciones diferentes (5 ng, 50 ng, 500 ng, 5 g y 50 g). Después de la exposición, el vigor de las plantas no se vio afectado. Además, se estudió el estrés oxidativo de tres maneras: a través de la medida de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de malondialdehído (MDA) de producción y también a través de la regulación de

glutación. En concentraciones ensayadas durante un corto período de tiempo, el nivel de ROS, MDA y glutación no fueron significativamente alterados.

Mukherjee *et al.* (2014), llevaron a cabo un estudio con NPs Fe-ZnO en plantas de chícharo (*Pisum sativum L.*) informaron que las concentraciones de 250 y 500 mg/L de NPs causaron un aumento en la actividad de CAT cultivadas en suelo. Variaciones en la actividad de la CAT dentro de los tejidos vegetales se han correlacionado a los estreses producidos por diferentes tipos y concentraciones de NPs.

### **Aplicación de nanopartículas de cobre en plantas**

Las NPs de Cu han atraído mucho la atención en los últimos años, se sabe que el cobre es un micronutriente esencial de las plantas que es requerido para su crecimiento y participa en reacciones de oxidación-reducción. Sin embargo, se convierte en un metal tóxico cuando se encuentra en los tejidos a concentraciones más altas a las necesarias para el crecimiento vegetal (30 mg/kg). El cobre promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), en forma enzimática y no enzimática (a través de la reacción de Fenton), las cuales pueden causar la oxidación de proteínas y lípidos, alterar la integridad de las membranas, la fotosíntesis, el crecimiento e inducir la muerte celular. Entre los mecanismos bioquímicos de defensa que se inducen en respuesta al daño oxidativo causado por cobre está el incremento de las actividades de enzimas antioxidantes tales como catalasa, superóxido dismutasa, glutación reductasa, ascorbato y guaiacol peroxidasas (León y Sepúlveda, 2012). Por lo que, inclusive

metales esenciales como el Cu son dañinos cuando se encuentran en exceso en forma iónica o bien en forma de nanopartículas.

Una investigación realizada por Adhikari *et al.* (2012), en la cual se llevaron a cabo experimentos para conocer el efecto de las nanopartículas de óxido Cu (50 nm) sobre la germinación y el crecimiento de las semillas de soja y garbanzo. Los resultados experimentales generales demostraron que la presencia de nanopartículas de CuO afecta el crecimiento de las plántulas soja de garbanzo a diferentes concentraciones. El crecimiento máximo se encontró en 100 ppm para soja y 60 ppm para las plántulas de garbanzo más allá de esta concentración, el crecimiento se inhibió. El crecimiento es eficaz en cierta concentración óptima, pero si es más alta inhibe el crecimiento y puede ser atribuido a la acumulación y la absorción de nanopartículas de óxido de cobre por las raíces. Se encontró que la acumulación y absorción de las nanopartículas fue dependiente de las concentraciones de exposición.

Por su parte los investigadores Lee *et al.* (2008), realizaron un estudio para conocer el efecto de las nanopartículas de Cu sobre el crecimiento y bioacumulación de las plantas *Phaseolus radiatus* (frijol mungo) y el *Triticum aestivum* (trigo). Todas las pruebas se llevaron a cabo en medios de agar-planta para prevenir la precipitación de las nanopartículas insolubles en agua en las unidades de prueba. Se examinó la inhibición del crecimiento de plantulas expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de Cu y se concluyó que las nanopartículas de cobre eran tóxicas para las plantas y también eran biodisponibles. Las concentraciones eficaces de nanopartículas de Cu fueron 335

mg/L para *Phaseolus radiatus* y 570 mg/L para *Triticum aestivum*. *Phaseolus radiatus* fue más sensible a las nanopartículas de Cu que *Triticum aestivum*.

Trujillo *et al.* (2014), realizaron un estudio en lechuga (*Lactuca sativa*) en el que se evaluaron las plántulas de lechuga de 18 días en un cultivo hidropónico y fueron tratadas durante 15 días con nanopartículas de Cu y CuO a una concentración de 10 y 20 mg/L, se determinaron los micro y macronutrientes, se evaluó el contenido de clorofila, crecimiento de las plantas, y las actividades de la catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX), los resultados mostraron que las nanopartículas de Cu reducen el contenido de agua, longitud de la raíz, y la biomasa seca de las plantas de lechuga. Los tratamientos con nanopartículas de Cu y CuO produjeron significativa acumulación de Cu en las raíces, todos los tratamientos de Cu incrementaron la actividad enzimática de catalasa (CAT) y disminuyeron la actividad de ascorbato peroxidasa (APX) en lechuga, los tratamientos alteraron la calidad nutricional de la lechuga, ya que las plantas tratadas tuvieron significativamente más Cu, Al y S pero menos Mn, P, Ca, y Mg.

Un estudio realizado por Pradhan *et al.* (2015), donde se evaluó el efecto de las nano partículas de cobre y sulfato de cobre (CS) en *Vigna radiata*, menciona que el tratamiento con sulfato cobre obtuvo los mejores resultados en las plantas en términos de morfología básica, contenido de pigmento y antioxidantes, el tratamiento con nanaopartículas de cobre demostró una asimilación de nitrógeno elevado en comparación con el sulfato de cobre. En dosis más altas de CS se encontró que puede ser tóxico para el sistema de la planta, mientras que las NPs de Cu no presentaron ninguna toxicidad para el sistema incluyendo alteraciones

morfológicas y/o fisiológicas. Mencionaron que las NPs de cobre pueden ser utilizadas como modificación nutricional, para equilibrar la disparidad nutricional por desequilibrio de cobre.

### **Quitósán e hidrogeles de quitósán**

Los hidrogeles de quitósán se preparan con el objetivo principal de encapsular sustancias para producir sistemas de dosificación que son de aplicación en la industria, en medicina, farmacia, biotecnología y en la agricultura (Juárez-Maldonado *et al.*, 2015).

Por su parte los hidrogeles constituyen un grupo de materiales poliméricos, su estructura hidrófila los hace capaz de contener grandes cantidades de agua en sus redes tridimensionales (Ahmed, 2013) y se atribuye a la presencia de varios grupos funcionales (*i.e.*, amino, carboxilo, amida, hidroxilo y ácido sulfónico) en los polímeros de la red de formación del hidrogel (Peppas, 1993). La clasificación de los hidrogeles depende de su estructura física y composición química, pueden ser clasificados como amorfo, semicristalino y cristalino (Ahmed, 2013).

Químicamente las redes reticuladas tienen uniones permanentes, mientras que las redes físicas tienen uniones transitorias que surgen de interacciones iónicas, enlaces de hidrogeno o interacciones hidrófobas. De acuerdo a la presencia o ausencia de carga eléctrica que se encuentran en las cadenas reticuladas, se clasifican en no iónico, iónico, anfótero electrolítico (que contiene tanto grupos ácidos y básicos) y de ion híbrido que contienen grupos tanto aniónicos y catiónicos en cada unidad repetitiva estructural (Ahmed, 2013).

El quitosano es un polisacárido lineal que tiene buena entidad química en la síntesis de hidrogeles debido a la mayor capacidad de reticulación y presencia del grupo amino ( $-NH_2$ ) (Kumar, 2000). Es un compuesto biodegradable natural derivado de las conchas de crustáceos como los cangrejos y camarones (Bautista *et al.*, 2006).

El quitosano es insoluble en la mayoría de disolventes, pero es soluble en ácidos orgánicos diluidos tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico, ácido láctico, y ácido málico. El quitosano posee propiedades (El Hadrami *et al.*, 2010). La actividad fungicida del quitosano se ha documentado contra diversas especies de hongos y oomicetos (Muzzarelli *et al.*, 1990). Promueve el crecimiento y la expresión de genes en los cloroplastos e incrementa la producción floral de orquídeas (Limpanavech *et al.*, 2008), es inductor de resistencia (Khan *et al.*, 2003).

### **Aplicaciones de las nanopartículas en hidrogeles de quitosán en la agricultura**

Juárez-Maldonado *et al.* (2015), realizaron un estudio en lechuga (*Lactuca sativa* L.). El objetivo fue evaluar las respuestas de inducción de antioxidantes en lechuga usando nanopartículas de cobre absorbidas en hidrogeles de quitosán nCu. El estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en una fase exploratoria estableciendo cinco tratamientos: 0.03, 0.015, 0.006, 0.003 y 0.0015 mg/L de nCu. En la etapa dos se hicieron tres tratamientos: el mejor de la etapa previa, quitosán y un testigo, evaluando el efecto en variables de vigor, contenido de minerales y compuestos antioxidantes en hojas. En la primera etapa, el

tratamiento de 0.06 g/L dio la mayor biomasa seca. En la segunda etapa el tratamiento con nCu-Cs generó el mayor peso fresco por planta, un 30% superior al testigo. En peso seco, longitud, peso fresco y seco de raíz no existieron diferencias. La aplicación de quitosán se asoció con la mayor conductancia estomática. Por otra parte, al aplicar nCu-Cs hubo mayor acumulación de Ca en la hoja, de Cu, Fe y K fue en la raíz y en las hojas Mg y Zn. Las unidades SPAD, catalasa, ascorbato peroxidasa, fenoles totales, glutatión peroxidasa, glutatión, superóxido dismutasa y proteínas no mostraron diferencias estadísticas. Por lo que, la aplicación de nCu-Cs aumenta significativamente el rendimiento de lechuga, modifica la concentración de Ca y no presenta algún efecto en los compuestos antioxidantes.

Otra investigación es la realizada por Juárez-Maldonado *et al.* (2015), consistió en evaluar el efecto de la aplicación de nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán sobre los compuestos antioxidantes en tomate. En tal estudio se usó una concentración de 100 mg/kg de NPs de cobre absorbidas en hidrogeles de quitosán, los resultados mostraron que el tratamiento con nCu presentó los mejores resultados en número de racimos y frutos, rendimiento, peso fresco y seco de parte aérea, así como en la conductancia estomática. En cuanto a los antioxidantes sólo se observaron diferencias estadísticas en la actividad enzimática de catalasa en las hojas y en el contenido de licopeno en fruto, siendo el mejor tratamiento el que incluyó nanopartículas de cobre. Los resultados positivos mostrados en las plantas de tomate se pueden atribuir a un estrés oxidativo.

## **METODOLOGÍA**

### **Etapas y localización**

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases la primera en un invernadero que se localiza en las coordenadas 25°21'21.50 latitud Norte y 101° 2'10.82 longitud Oeste, a una altitud de 1763 msnm, ubicado en el Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista Saltillo, Coahuila.

La segunda fase se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal perteneciente al Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México.

### **Desarrollo experimental**

La siembra de las plantas de tomate se llevaron a cabo en un invernadero tipo multitunel con orientación Sur-Norte, cuenta con dimensiones de 30 m de largo y 15 de ancho con cubierta plástica de polietileno, ventilación lateral y cenital manual, cuenta con una cubierta de suelo color blanco, y el rango de temperatura oscila entre los 37°C en el día y en la noche alcanza hasta los 15°C, con una humedad relativa entre 50-70%. Se utilizaron charolas de polietileno de 200 cavidades las cuales se desinfectaron con una solución clorada para eliminar cualquier tipo de residuos. La preparación de sustrato para la siembra en charola fue de peat moss y perlita (50:50 v/v) el cual se mezcló de manera uniforme y se le agrego agua para mantener la humedad y así de esta manera se pudo facilitar el llenado de la charola.

La siembra se llevó a cabo con semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) tipo saladette, de crecimiento indeterminado hibrido Huno F1 (Harris Moran). Los riegos se aplicaron todos los días con solución nutritiva (Steiner, 1961) al 25% de concentración de manera uniforme en toda la charola hasta que se alcanzó la etapa de plántula (30 días) para su posterior trasplante.

La preparación del sustrato para el trasplante se realizó en bolsas de color negro (40 x 40) de 12 L. Se usó una mezcla de peat moss y perlita (50:50, v/v) con una

humedad uniforme. Las nanopartículas utilizadas en el estudio fueron de 25 nm marca SKySpring nanomaterials inc. Por su parte, los hidrogeles de quitosán usados fueron de la marca Marine Chemicals (PM=200,000). Los tratamientos se aplicaron al sustrato de la siguiente manera: Tratamiento 1 (T1): se distribuyó 1 gramo de hidrogeles de quitosán + NPs de Cu (10mg) en la parte baja, media y alta de la maceta; Tratamiento 2 (T2): 1 gramo de hidrogeles de quitosán en la parte baja, media y alta de cada maceta; y Tratamiento 3 (T3): testigo absoluto.

El trasplante se realizó cuando las plántulas tenían 4 hojas verdaderas. Se colocó un sistema de riego dirigido, se usó un timer marca TAYLOR modelo 5806 para la aplicación de cuatro riegos por día con solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961) con cloruro de sodio a una concentración de 100mM. Los microelementos se aplicaron en forma de quelatos. La concentración de la solución Steiner se ajustó de acuerdo con la etapa fenológica del cultivo: 25% durante dos semanas a partir del trasplante, 50% las semanas 3 y 4, 75% las semanas 5 y 6, y 100% a partir de la semana 7, con 5.8 kg de cloruro de sodio en la solución nutritiva durante todo el ciclo.

Durante el desarrollo del cultivo se realizaron labores culturales como el tutorado que se llevó a cabo cuando la planta alcanzo una altura aproximadamente de 30 cm y se utilizó rafia de propileno la cual se sujetó a 2 metros de altura sobre los tensores de alambre del invernadero, el tutorado a un tallo procurando el crecimiento en longitud de cada una de las plantas.

La poda de brotes, imprescindible para las variedades de crecimiento indeterminado se realizó cada tres días, eliminando las yemas axilares.

De igual manera, la poda de hojas se realizó cada siete días eliminando las hojas inferiores senescentes por debajo del último racimo, esto con el fin de facilitar la aireación y mejorar el color de los frutos.

## **Variables evaluadas**

### **Variables agronómicas**

Las variables de crecimiento se evaluaron 75 días después del trasplante (diámetro del tallo en cada planta, la altura de la planta, número de hojas por planta, número de racimos y número de frutos amarrados), y la acumulación de biomasa (peso fresco y seco aéreo y radicular) y rendimiento se midieron 175 ddt. El diámetro del tallo se midió entre la tercera y cuarta hoja de la parte basal de la planta, con un vernier marca KD-TOOLS modelo KDT3756. La altura con una cinta métrica marca Stanley modelo 30-615. Se realizó el conteo manual del número de hojas, racimos desarrollados y frutos amarrados.

El rendimiento se obtuvo cuando los frutos estuvieron en la etapa de maduración, se cosecho y se pesó cada fruto por planta en una balanza analítica marca PIONEER modelo PA1502, esto se realizó cuando los frutos estuvieran en estado maduro.

Los datos de peso fresco de la planta se obtuvieron al final del cultivo al disectar y separar las hojas y el tallo, colocándolos en bolsas de papel marcadas y pesando en una balanza analítica marca PIONEER modelo PA1502. Después de su deshidratación en un horno de secado marca Linderberg/blue modelo GO1350C-1 a 80°C por 72 horas se obtuvo la biomasa seca.

La raíz se extrajo separando el sustrato de la maceta manualmente y se retiró el exceso de sustrato con agua, por último, se pesó en la balanza marca PIONEER modelo PA1502. Para obtener el peso seco se colocaron las bolsas de papel y se colocaron en una estufa de secado marca Linderberg/blue modelo GO1350C-1 por 72 horas aproximadamente, con temperatura de 80 °C, por último, se pesaron en la balanza.

### **Calidad del fruto**

La acidez titulable (% de ácido cítrico) se calculó tomando 10 ml de pulpa de cada fruto, a la cual se añadieron 2 gotas de fenolftaleína (1%) y se tituló con NaOH 0.1 N (AOAC, 1990).

Los sólidos solubles totales (°Brix) se determinaron con un refractómetro manual de 0 a 32% Atago modelo ATC1E, así como el pH con un potenciómetro HI 98130 de Hanna Instruments.

El contenido de Vitamina C se determinó por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol. Se pesaron 10 g de fruto fresco y se maceraron en un mortero con 10 mL de HCl al 2%, después se filtró a través de una gasa absorbente estéril sobre un matraz de aforación de 100 mL. Se tomó una alícuota de 10 ml y se tituló con 2,6 diclorofenolindofenol hasta obtener una coloración rosácea persistente. Los resultados se expresaron en mg/100 g de peso fresco.

Para obtener la cantidad de licopeno en fruto, se tomaron muestras de frutos que presentaran características similares como tiempo de maduración, tamaño, color, etc., y se cuantificó por medio de una técnica de espectrofotometría (Fish *et al.*,

2002). A 3 g de pericarpio del fruto fresco se agregan 3 mL de solución buffer de fosfatos (pH 7) y se muelen en un mortero, posteriormente se tomaron 2 mL de la muestra y 4 mL de la mezcla hexano:acetona (3:2) centrifugando durante 10 min a 3000 rpm. Por último, se determina la absorbancia a 503 nm del sobrenadante resultante que corresponde a los mg/100 g de peso fresco  $\mu\text{g g}^{-1}$  de licopeno.

### **Pigmentos de la hoja**

Determinación de contenido de clorofila y carotenoides. Las hojas de tomate de cada tratamiento se criogenizaron con nitrógeno líquido, después se tomó 0.1 g y se adicionó 1 mL de acetona al 100%, enseguida se centrifugó a 3024 g por 5 min. Se tomó 0.05 mL del sobrenadante y se le agregó 0.95 mL de acetona al 80% (buffer de fosfato de sodio 2.5 mM pH 7.8), como blanco se utilizó acetona al 80%, posteriormente se estimó los contenidos de clorofila (Porra, 2002) y carotenoides totales (Wellburn, 1994) espectrofotométricamente y se expresaron en  $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco.

### **Actividad enzimática**

La cuantificación de la actividad enzimática se llevó a cabo en tejido fresco de hojas y frutos colectados a los 60 días después del trasplante (ddt). Las muestras se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se liofilizaron. Se tomaron 200 mg de tejido liofilizado, se molieron en un mortero y se colocaron en un tubo para microcentrífuga agregando 20 mg de polivinil pirrolidona, 1.5 ml de buffer de fosfatos pH 7-7.2 (0.1 M). El extracto obtenido se centrifugó a 12000 rpm por 10

minutos a 4°C en una microcentrífuga (Labnet Int. Inc., Modelo Prism™ R), el sobrenadante fue recolectado y filtrado con una membrana de nylon (Ramos *et al.*, 2010), finalmente se diluyó en una proporción 1:20 con buffer de fosfatos para el análisis de acuerdo a las siguientes metodologías.

Medición de actividad enzimática catalasa (CAT): Se midió de acuerdo a Beers y Sizer (1952). Se preparó un blanco para cada muestra: 930 µL de buffer de fosfatos y 70 µL del extracto. Después se tomaron 70 µL del extracto y se le agregó 920 µL de buffer de fosfatos, se añadió 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 M) para iniciar la reacción. Se anotó la absorbancia inicial, después cada 20 segundos durante 3 minutos. La descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue seguido por la disminución de la absorbancia a 270 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se preparó una curva de calibración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20-100 mM) y los resultados fueron expresados en mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> por proteínas totales (mg g<sup>-1</sup>).

Glutación peroxidasa (GPX): se utilizó el método modificado por Floe and Gunze (1984) usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato. Se tomaron 0.2 ml de extracto enzimático y se añadieron 0.4 ml de glutación reducido (0.1 M) y 0.2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.067 M), esta mezcla se pre-calentó en baño de agua a 25 °C por 5 minutos, posteriormente se le agregaron 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM) para iniciar la reacción catalítica. Se dejó reaccionar por 10 min y se detuvo mediante la adición de 1 ml de ácido tricloro acético al 1%, posteriormente esta mezcla se puso en baño de hielo por 30 min. Enseguida se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Finalmente 0.48 ml del sobrenadante se colocaron en celdilla y se le agregaron 2.2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.32 M) y 0.32 ml (1 mM) del colorante 5,5 ditio-bis-2 ácido nitro

benzoico (DTNB Sigma), posteriormente se lee la mezcla en un espectrofotómetro UV-Vis a 412 nm (Xue *et al.*, 2001).

Glutación: se realizó colorimétricamente mediante la reacción con 5,5 ditio-bis-2 ácido nitrobenzoico. En un tubo de ensayo se tomaron 0.48 ml del extracto enzimático y se le agregaron 2.2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.32 M) más 0.32 ml del colorante DTNB (1 mM). Se mezcló perfectamente y se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis a 412 nm (Xue *et al.*, 2001) la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración previamente estandarizada con glutación reducido.

Ascorbato peroxidasa (APX): la cuantificación de la actividad de la ascorbato peroxidasa se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por Nakano y Asada (1981). Se preparó un blanco: 700 µL de buffer de fosfatos, 100 µL de EDTA (1mM), 100 µL de Ascorbato (5 mM) y 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). Posteriormente se tomaron 100 µL del extracto y se le agregaron 600 µL de buffer de fosfatos más 100 µL de EDTA (1mM), 100 µL de Ascorbato (5 mM) y 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) para iniciar la reacción. Se anotó la absorbancia inicial y la final después de 1 minuto. La oxidación del ascorbato fue seguido por la disminución de la absorbancia a 266 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Los resultados fueron expresados en µmol de ascorbato min<sup>-1</sup> por proteínas totales (mg g<sup>-1</sup>).

El contenido de fenoles totales se determinó de acuerdo a la metodología de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se pesaron 250 mg de hoja criogenizada con nitrógeno líquido y se agregó 1 mL de metanol al 80%, después se sometió a centrifugar a 10 000 rpm durante 15 min. Se recuperó el

sobrenadante y con el pellet se repitió el mismo procedimiento con metanol concentrado. El sobrenadante se ajustó a 2 mL con metanol concentrado y se pusieron en oscuridad. Posteriormente, se tomaron 200  $\mu$ L del extracto más 1.5 mL de agua destilada, después se agregaron 100  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu, enseguida se añadió 200  $\mu$ L  $\text{NaCO}_3$  al 20% y se dejó reposar durante 30 min. La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico (0.02-0.4 mg/mL) y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por g de peso fresco.

### **Diseño experimental**

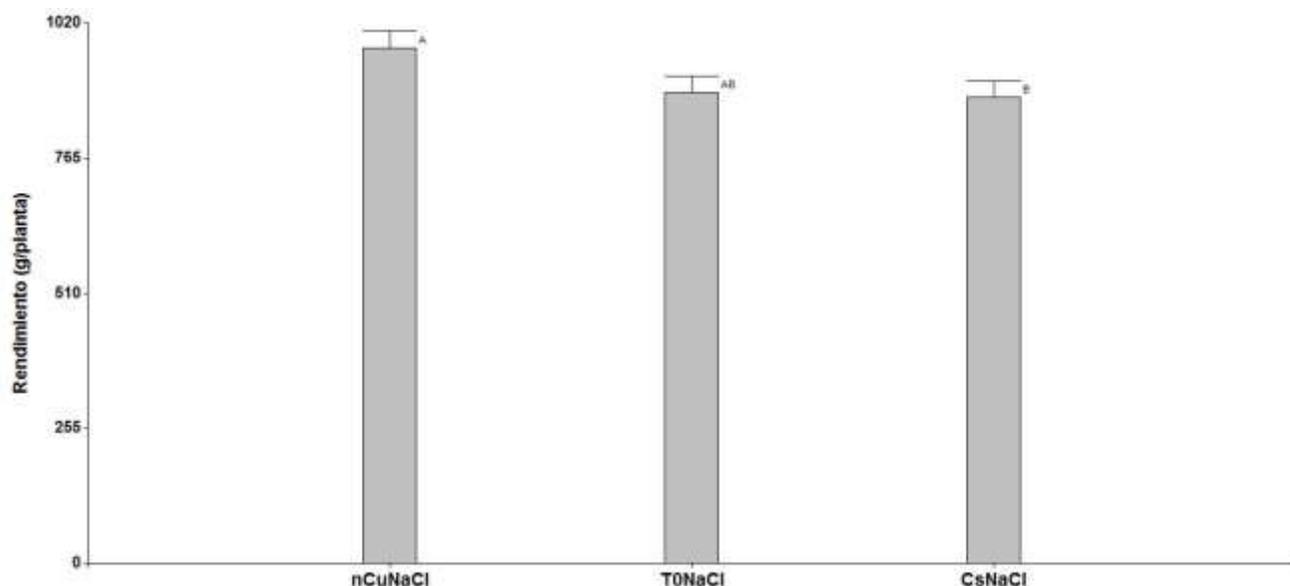
Se usó un diseño completamente al azar, para variables agronómicas se tomaron 16 repeticiones por tratamiento, y para el resto de las variables se consideraron 5 repeticiones por tratamiento. Se realizó un ANOVA y una prueba de comparación de medias LSD ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Variables agronómicas**

Los resultados de la evaluación para variables agronómicas en plantas de tomate bajo condiciones de estrés salino son presentados en la Tabla 1. Se observaron diferencias estadísticas (LSD,  $p < 0.05$ ) en el rendimiento y altura de las plantas, sin embargo, en las variables número de hojas, número de racimos, número de frutos, peso fresco de la parte aérea, peso fresco de la raíz, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz, altura y diámetro de tallo no se presentaron diferencias (Figura 1 y Tabla 1). En cuanto a rendimiento el tratamiento con

nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán-PVA presentó un incremento significativo con respecto al testigo (9%). Estos resultados coinciden con Wang *et al.* (2012), quienes determinaron que las nanopartículas de óxido de cerio ( $\text{CeO}_2$ ) a diferentes concentraciones (0.1 a 10 mg/L) tuvieron efectos positivos sobre el rendimiento de tomate. En una investigación realizada por Magán *et al.* (2008), en la que se estudiaron el efecto de la salinidad sobre el rendimiento y la calidad del tomate bajo invernadero, reportaron un aumento de la pudrición de las flores en los tratamientos con salinidad lo que contribuyó a una reducción en el rendimiento. Por otra parte Gossett *et al.* (1994), evaluaron el efecto de NaCl en diferentes variedades de algodón, para determinar el nivel de tolerancia a la sal y se determinó que las variedades con más tolerancia fueron aquellas que presentaron una mayor actividad de las enzimas catalasa, peroxidasa, glutatión reductasa, los datos indican que la protección contra el daño oxidativo está dada por niveles más altos de antioxidantes sugiriendo que puede estar implicado en el desarrollo de la tolerancia a sal en el algodón. La respuesta positiva en cuanto al rendimiento en el presente trabajo es similar a lo reportado por Juárez-Maldonado *et al.* (2015), esto se asocia a una mayor capacidad antioxidante lo que genera tolerancia al estrés salino y aumenta el rendimiento. El tratamiento a base a quitosán no fue superior al testigo, mostró resultados diferentes a lo reportado por Bautista *et al.* (2006), quienes concluyen que el quitosán aumento el rendimiento del cultivo de tomate cosechado.



**Figura 1.** Efecto de nanopartículas de cobre (nCu)+ quitosán (Cs) en la variable rendimiento en plantas de tomate bajo estrés salino (NaCl). Trat:nCuNaCl: nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán + NaCl. CsNaCl: hidrogel de quitosán sin nanopartículas de cobre + NaCl. ToNaCl: 100 mM de NaCl.

Para la variable de altura el mejor tratamiento fue el de quitosán el cual fue superior al testigo por un 2.3%, al igual que Saharan *et al.* (2015), que reportaron un efecto promotor en la longitud de las plantas de tomate al exponerlas a la combinación de nanopartículas de cobre-quitosán a una concentración de 0.12%.

**Tabla 1.** Variables agronómicas del cultivo de tomate aplicando nanopartículas de Cobre (nCu) + quitosán (Cs) bajo condiciones de estrés salino (NaCl).

Tratamiento	nCuNaCl	CsNaCl	TONaCl
PFA (g)	1156.64 A	1148.06 A	1086.69 A
PFR (g)	128.11 A	131.21 A	110.99 A
PSA (g)	164.81 A	156.34 A	153.01 A

PSR (g)	17.61 A	16.62 A	18.21 A
Altura(cm)	143.88 B	150.94 A	147.56 AB
DT (mm)	12.52 A	12.67 A	12.49 A
Hojas	23.06 A	23.19 A	22.81 A
Racimos	22.81 A	5.75 A	5.88 A
Frutos	25.5 A	24.56 A	25.19 A

Trat: tratamientos. nCuNaCl: nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán + NaCl. CsNaCl: hidrogel de quitosán sin nanopartículas de cobre +NaCl. T0: testigo sin aplicación de hidrogeles ni nanopartículas de cobre con NaCl. REN: rendimiento. PFA: peso fresco de la parte aérea. PFR: peso fresco de la raíz. PSA: peso seco de la parte aérea. PSR: peso seco de la raíz. DT: diámetro de tallo. NH: número de hojas. NR: número de racimos.NF: número de frutos.NH: número de hojas. Letras diferentes por fila indican diferencias significativas (LSD Fisher,  $p < 0.05$ ).

Por otra parte el tratamiento menos eficiente fue el de nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán, al contrario de Jo *et al.* (2015), que evaluaron nanopartículas pero de plata en plántulas de arroz a una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ , llegando a la conclusión que aumentan significativamente la altura de este cultivo en relación con el Testigo, de igual manera, Hanif *et al.* (2015), reportaron que la aplicación de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  incremento la altura de la lechuga a una concentración de 100  $\text{mg/kg}$ . Juárez-Maldonado *et al.* (2015), reportaron el efecto de las nanopartículas de cobre absorbidas en hidrogeles de quitosán a una concentración de 0.06  $\text{g/L}$  en lechuga y observaron que no hubo diferencias estadísticas en cuanto a la altura de las plantas en relación con el testigo, resultados semejantes a esta investigación.

Finalmente, aunque se utilizó quitosán y nanopartículas de cobre los resultados en esta variable fueron poco significativos, probablemente por el efecto de la sal

en los tratamientos, como lo menciona Romero-Aranda *et al.* (2001), donde se demostró que la altura de las plantas de tomate disminuye con el incremento de la salinidad.

### **Variables de pigmentos de las hojas**

Para las variables de pigmentos de la hoja de plantas de tomate sometidas a estrés salino, los resultados se presentan en la Tabla 2. Se observó que el tratamiento de solo quitosán fue superior al testigo en un 15% en clorofila a, en clorofila b 22%, en clorofila total 16% y en carotenoides en un 16%, mientras que para la relación de clorofila a.b el mejor tratamiento fue el testigo. Se ha planteado que una de las causas de la disminución de la intensidad de la fotosíntesis bajo estrés salino, lo constituye la disminución de la concentración de pigmentos en las hojas de las plantas. En un experimento en el cultivo del arroz se señalaron afectaciones marcadas en la concentración de pigmentos por efecto de la salinidad y atribuyeron tales afectaciones a la destrucción de la estructura de las membranas de los cloroplastos donde se localiza la clorofila (González *et al.*, 1999). Los resultados positivos para el tratamiento con quitosán coinciden con lo reportado por Limpanavech *et al.*, (2008), quienes concluyen que el cloroplasto es uno de los sitios más importantes para la acción del quitosán y de esta manera se promovió el crecimiento y la producción floral de orquídeas. Por otro lado, Pavani *et al.*, (2015) evaluaron el efecto de las nanopartículas de óxido de gammaférrico sobre tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como resultado observaron cambios en los contenidos de clorofila a, clorofila b, y carotenos

totales, así como un aumento el rendimiento del cultivo y una menor clorosis a una concentración de 0.5M.

**Tabla 2.** Variables de pigmentos de la hoja del cultivo de tomate aplicando nanopartículas de Cobre (nCu) + quitosán (Cs) bajo condiciones de estrés salino:

TRAT	Chla mg g <sup>-1</sup>	Chlb mg g <sup>-1</sup>	Chl total mg g <sup>-1</sup>	Carotenoides mg g <sup>-1</sup>	Chl a/Chl b mg g <sup>-1</sup>
nCuNaCl	206.47 B	67.3 B	273.77 B	38.17 B	3.05 AB
CsNaCl	273.98 A	93.01 A	366.99 A	51.81 A	2.94 B
T0NaCl	237.76 AB	76.03 B	313.79 AB	44.48 B	3.12 A

Trat: tratamientos. nCuNaCl: nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán + NaCl. CsNaCl: hidrogel de quitosán sin nanopartículas de cobre + NaCl. T0: testigo sin aplicación de hidrogeles ni nanopartículas con NaCl, Chla: clorofila a. Chlb: clorofila b. Chltotal: clorofila total. Letras diferentes por columna indican diferencias significativas (LSD Fisher, p<0.05).

### Variables de calidad del fruto

Los resultados de la evaluación de las variables de calidad del fruto de tomate se presentan en la Tabla 3 y Figura 2. Se observaron diferencias en las variables pH y contenido de vitamina C caso contrario a SST (°Brix), acidez titulable y licopeno donde no se observaron diferencias estadísticas. El tratamiento con NPs de Cu en hidrogel de quitosán bajo condiciones de estrés salino incremento un 33% el contenido de vitamina C en comparación con el testigo, mientras que el quitosán presentó un 42% más que el testigo (Figura 2). La respuesta en el

presente trabajo es similar a lo reportado por Juárez-Maldonado *et al.* (2015), quienes concluyeron que la aplicación de nanopartículas de cobre resulta en una mayor generación de antioxidantes, así la planta tendrá mayor capacidad de tolerar algún tipo de estrés ya sea biótico y/o abiótico. Uhram *et al.*, (2013), aplicaron al cultivo de tomate nanopartículas de óxido de titanio (nano-TiO<sub>2</sub>) en forma de aerosol, lo cual dio como resultado una mayor actividad antioxidante en frutos a una concentración de 5000 mg/kg. Los resultados positivos en el incremento de la vitamina C con el tratamiento a base de quitosán concuerdan Deepmala y Hemantaranjan (2015) quienes concluyen que el quitosán debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad puede ser aplicado en la agricultura, indicando que reduce el efecto perjudicial de las plantas en estrés, afecta las respuestas fisiológicas e incrementa los mecanismos de defensa en las plantas como los antioxidantes.

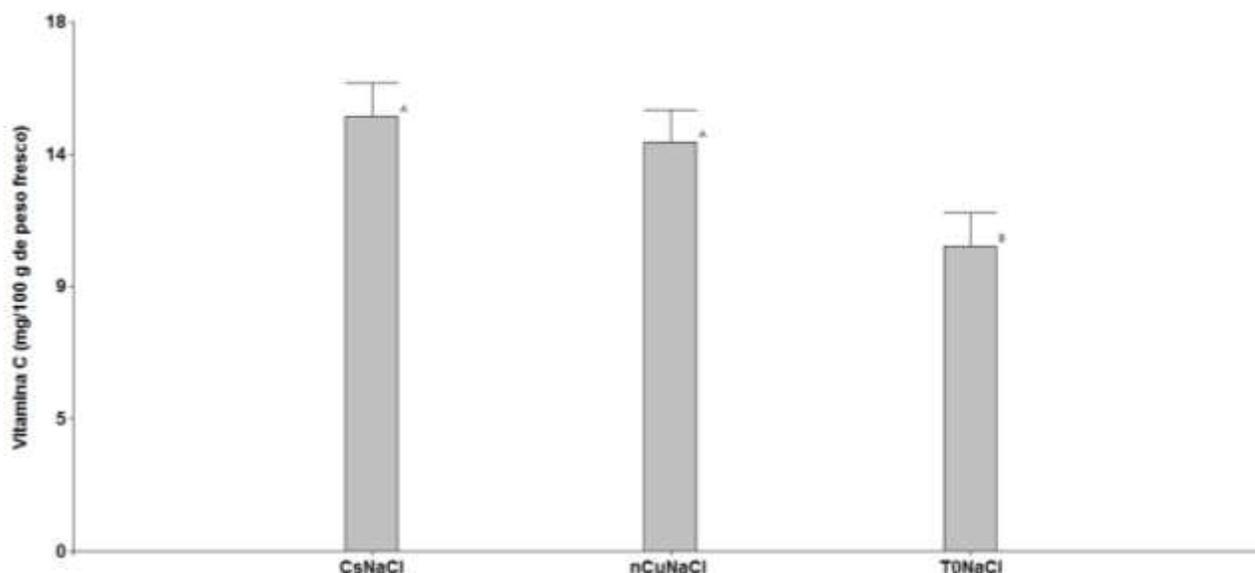
Para la variable de pH los mejores tratamientos fueron los de quitosán y nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán los cuales fueron superiores al Testigo en un 2.3 y 1% respectivamente, al igual que Juárez-Maldonado *et al.* (2015), quienes concluyeron que los tratamientos de nanopartículas de cobre absorbidas en hidrogeles de quitosán y el quitosán fueron superior al Testigo, sin embargo en dicha investigación el mejor tratamiento fue el de nanopartículas de cobre en quitosán.

**Tabla 3.** Variables relacionadas a la calidad de fruto de tomate tratado con nanopartículas de cobre + quitosán bajo estrés salino. Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas según LSD Fisher,  $p < 0.05$

TRAT	pH	°Brix	Ac.Titulable (%)	Licopeno (µg/g)
nCuNaCl	4.04 AB	9.16 A	0.68 A	0.04 A
CsNaCl	4.09 A	9.08 A	0.68 A	0.03 A
TONaCl	4 B	8.80 A	0.64 A	0.03 A

Trat: tratamientos. nCuNaCl: nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán + NaCl. CsNaCl: hidrogel de quitosán sin nanopartículas + NaCl. T0: testigo sin aplicación de hidrogeles ni nanopartículas de cobre con NaCl. Letras diferentes por columna indican diferencias significativas (LSD Fisher,  $p < 0.05$ ).

Por otra parte, Yurtseven *et al.* (2005), menciona que en tratamientos salinos el pH disminuye un 12% en tomate H2274-Oturak en concentraciones que van desde 0.25 a 10 dS/m, contrario a esta investigación donde el pH se vio incrementado en los tratamientos de nanopartículas de cobre en quitosán y quitosán bajo condiciones de estrés salino.



**Figura 2.** Efecto de quitosán (Cs) y nanopartículas de cobre (nCu) en la vitamina C de fruto de tomate bajo condiciones de estrés salino (NaCl). Trat: nCuNaCl: nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán + NaCl. CsNaCl: hidrogel de quitosán sin nanopartículas de cobre + NaCl. ToNaCl: testigo sin aplicación de hidrogeles ni nanopartículas de cobre con NaCl.

### **Variables de compuestos antioxidantes**

Respecto al contenido de compuestos antioxidantes en las hojas y frutos de las plantas de tomate los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4, se observaron diferencias en catalasa de fruto y glutatión de fruto y hoja. En la actividad del glutatión en hoja se mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, siendo el tratamiento a base de quitosán superior al testigo en un 51% y el tratamiento de hidrogel de quitosán con nCu fue superior al testigo en un 26%. Esto concuerda con lo reportado en una investigación realizada por Faisal *et al.* (2013), en la cual se examinaron NPs de NiO en un intervalo de concentración de 0.025-2.0 mg/ml para la inducción de estrés oxidativo en las

raíces de plántulas de tomate, como un modelo in vivo para la evaluación de nanotoxicidad en las plantas. En comparación con el testigo la actividad del glutati6n fue 2.6 veces mayor. Trujillo-Reyes *et al.* (2014), observaron una disminuci6n de la actividad de ascorbato peroxidasa en las hojas de lechuga al aplicar 20 mg/L de nanopartículas de cobre y Nhan *et al.* (2014), reportaron un aumento en la actividad de super6xido dismutasa en algod6n al aplicar 10 y 500 mg/L de NPs de SiO<sub>2</sub>, esto pudo deberse a la alta concentraci6n de NPs usada en los estudios mencionados en comparaci6n con la del presente estudio.

En la actividad de catalasa medida en el fruto de tomate se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (LSD,  $p < 0.05$ ). En dicha variable el testigo present6 mayor actividad de la catalasa, esto es diferente a lo reportado por Trujillo-Reyes *et al.* (2014), ya que ellos mencionan que al aplicar 10 mg/L de nanopartículas de cobre se increment6 la actividad de catalasa, pero disminuy6 la actividad de ascorbato peroxidasa en la raíz. De igual manera Mukherjee *et al.* (2014), llevaron a cabo un estudio con NPs de Fe-ZnO en plantas de chícharo (*Pisum sativum* L.) informaron que las concentraciones de 250 y 500 mg/L de NPs causaron un aumento en la actividad de la catalasa.

Por otro parte el contenido de fenoles en la hoja se vio incrementado en los tratamientos de quitosán y nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán en relaci6n con el testigo, en un 54 y 15% respectivamente. Michalak (2006), menciona que los fenoles son antioxidantes que desencadenan una serie de metabolitos secundarios sintetizados a través de la ruta del ácido siquímico o por la vía del ácido mal6nico ejerciendo funciones de seálizaci6n celular en

condiciones de estrés abiótico. De esta manera el quitosán y las nanopartículas de Cu son inductoras fenoles en las plantas, activando su mecanismo de defensa contras estrés biótico y abiótico.

**Tabla 4.** Contenido de compuestos antioxidantes en hojas y frutos de tomate tratado con hidrogeles de quitosán-nCu bajo condiciones de estrés salino

Órgano	Tratamiento	nCuNaCl	CsNaCl	T0
FRUTO	APX	155.46 A	145.52 A	181.54 A
	CAT	24.35 B	25.48 B	59.3 A
	GPX	4.14 A	3.97 A	4.68 A
	GLUTATION	60.2 B	56.56 B	98.36 A
HOJA	APX	101.3 A	113.5 A	107.39 A
	CAT	8.31 A	11.26 A	11.99 A
	GPX	2.91 A	2.9 A	2.54 A
	GLUTATION	56.12 B	67.2 A	44.26 C
	FENOLES	3.18 A	4.27 A	2.77 A

Trat: tratamientos. nCuNaCl: nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán + NaCl. CsNaCl: hidrogel de quitosán sin nanopartículas de cobre + NaCl. T0: testigo sin aplicación de hidrogeles ni nanopartículas de cobre con NaCl. APX: ascorbato peroxidasa. CAT: catalasa. GPX: glutatión peroxidasa. Letras diferentes por fila indican diferencias significativas (LSD Fisher,  $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

La aplicación de nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán más 100 mM de NaCl presentó mayor rendimiento de frutos por planta, con un incremento del 9% en relación con el testigo (100 mM NaCl). Mientras que la altura de la planta se incrementó con la aplicación de quitosán.

Los resultados mostraron un incremento en la producción de vitamina C y pH con la aplicación tanto de quitosán como de nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán.

La aplicación de quitosán incremento el contenido de clorofilas, tanto la clorofila a, b, total y carotenoides.

En cuanto a la generación de compuestos antioxidantes en la hoja y fruto, los resultados mostraron que la aplicación de quitosán y nanopartículas de cobre incrementaron la cantidad de Glutación y fenoles.

Se demostró que la aplicación de nanopartículas de cobre + hidrogeles de quitosán tiene efecto positivo en la tolerancia al estrés salino por plantas de tomate.

## **LITERATURA CITADA**

- Adhikari, T., Kundu, S., and Subba Rao, A. (2013). Impact of SiO<sub>2</sub> and Mo nanoparticles on seed germination of rice (*Oryza sativa L.*). *Internacional Journal of Agriculture and Food Science Technology*. 4 (8): 809-816.
- Adhikari, T., Kundu, S., Biswas, A. K., Tarafdar, J. C., and Rao, A. S. (2012). Effect of copper oxide nanoparticle on seed germination of selected crops. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2 (6A): 815-823
- Adner, D., Korb, M., Schulze, S., Hietschold, M., and Lang, H. (2013). A straightforward approach to oxide-free copper nanoparticles by thermal decomposition of a copper (I) precursor. *Chemical Communications*. 49 (61):6855-6857.
- Agrawal, S., and Rathore, P. (2014). Nanotechnology pros and cons to agriculture: A review. *International Journal of Curred Microbiol and Applied Sciences*. 3 (3):43-55.
- Ahmed, E. M. (2013). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*. 6 (2):105-121.
- Amini, F., Ehsanpour, A. A., Hoang, Q. T., and Shin, J. S. (2007). Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of plant physiology*. 54 (4):464-471.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Arlington, Virginia, USA. Pp. 384.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., and Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an

environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*. 4 (10):634-641.

Azeredo, H., Mattoso, L. H. C., Wood, D., Williams, T. G., Avena-Bustillos, R. J., and McHugh, T. H. (2009). Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *Journal of food science*.74 (5): 31-35.

Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*.25 (2): 108-118.

Benavides, A., R. Foroughbakhch y M.J. Verde. (1999). Alta correlación de la productividad con los sólidos solubles y redox de peciolas en espinacas. *Ciencia UANL*. 2: 373-378.

Beers RF, Sizer IW. Article : a Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide By. *J Biol Chem*. 1952;195:133-140.

Bhattacharyya, A., R. Chandraseker, C.A. Kumar, T.T. Epiidi and R. P. Shetty. (2014). Application of nanoparticles in sustainable agriculture: Its current status. The international mission of the book. Kansas City. USA. 448 pp.

Canivet, L., Dubot, P., Garçon, G., and Denayer, F. O. (2015). Effects of engineered iron nanoparticles on the bryophyte, *Physcomitrella patens*

(Hedw.) Bruch and Schimp, after foliar exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*.113:499-505.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., and Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*.45 (2): 437-448.

Cifuentes, Z., L. Custardoy, J. De la Fuente, C. Marrquina, M.R. Ibarra, D. Rubiales and A. Perez-de-Luque. (2010). Absorption and traslocation to the aerial part of magnetic carbón-coated nanoparticles through the rood of different crop plants. *Journal of Nanobiotechnology*. 8-26.

Corral-Diaz, B., Peralta-Videa, J. R., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Morales, M. I., Osuna-Avila, P., and Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Cerium oxide nanoparticles alter the antioxidant capacity but do not impact tuber ionome in *Raphanus sativus* (L). *Plant Physiology and Biochemistry*.84: 277-285.

Da Costa, M. V. J., and Sharma, P. K. (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 54(1), 110-119.

Dawson, N. G. (2008). Sweating the small stuff.environmental risk and nanotechnology. *BioScience*. 58 (8):690-690.

Deepmala K. and A. Hemantaranjan. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*. 1(20): 1-9.

- Díez, M. J., and Nuez, F. (2008). Tomato. In *Vegetables II* (pp. 249-323). Springer New York.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., and Krupa, Z. (2003). Response of the ascorbate–glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*.164 (2): 195-202.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., and Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine drugs*. 8 (4): 968-987
- Elejalde, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *anales de Medicina Interna*.18 (6): 50-59.
- Fages, S. E. (2013). Investigación de fibras de polipropileno aditivas con nanopartículas de plata para la mejora de propiedades bioactivas en el sector textil. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica De Valencia. Valencia, España.399 pp.
- Faisal, M., Saquib, Q., Alatar, A. A., Al-Khedhairy, A. A., Hegazy, A. K., and Musarrat, J. (2013). Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: a study on mechanism of cell death. *Journal of hazardous materials*. 250: 318-332.
- Ferrer, T.E. (2012). Investigación en nanotecnología con aplicaciones en microbiología, biotecnología y ciencias. *Revista 360° de la Universidad Interamericana de Puerto Rico*.7:1-10.

- Fish, W. W., Perkins-Veazie, P., and Collins, J. K. (2002). A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of food composition and analysis*. 15(3): 309-317.
- Flohé, L., and Gunzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*.105:114-120.
- Ghormade, V., Deshpande, M. V., and Paknikar, K. M. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology advances*: 29(6):792-803.
- González, L. M., y Ramírez, R. (1999). Respiración, relaciones hídricas y concentración de pigmentos en plántulas de arroz cultivadas en condiciones salinas. *Cultivos Tropicales*. 20(1):35-37.
- Gossett, D. R., Millhollon, E. P., and Lucas, M. (1994). Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*, 34(3), 706-714.
- Gruere, G. P. (2012). Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries. *Food Policy*.37 (2):191-198.
- Hojjat, S. S and Hojjat, H. (2015). Effect of Nano Silver on Seed Germination and Seedling Growth in Fenugreek Seed. *International Journal of Food Engineering*.1:106-110.
- Hong, J., Wang, L., Sun, Y., Zhao, L., Niu, G., Tan, W., and Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Foliar applied nanoscale and microscale CeO<sub>2</sub> and CuO alter

cucumber (*Cucumis sativus*) fruit quality. *Science of The Total Environment*. 563:904-911.

Jenkins, J. A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379-392.

Jo, Y. K., Cromwell, W., Jeong, H. K., Thorkelson, J., Roh, J. H., and Shin, D. B. (2015). Use of silver nanoparticles for managing *Gibberella fujikuroi* on rice seedlings. *Crop Protection*, 74, 65-69.

Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Benavides-Mendoza, A., Cadenas-Pliego, G., and Pérez-Labrada, F. (2015). Efecto de la aplicación de hidrogeles de quitosán nCU sobre los compuestos antioxidantes en tomate. In "Simpósio Iberoamericano de Quitina" (S. i. d. quitina, ed.), pp. 90, Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Benavides-Mendoza, A., Cadenas-Pliego, G., and Pérez-Labrada, F. (2015). Efecto en el rendimiento, contenido de minerales y compuestos antioxidantes en lechuga con aplicación de nanopartículas de Cu absorbidas en hidrogeles de quitosano. XV congreso iberoamericano para el desarrollo y aplicación de los plásticos en la agricultura, 318 pp. Saltillo, Coahuila, México. 28-30 octubre 2015.

Kalia, P., and Palanisamy, M. (2014). Tomato. In *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, Volume 2 (pp. 347-380). Springer New York.

- Karami, S. M., Heidari, R., and Rahmani, F. (2015). Effect of silver nanoparticles on free amino acids content and antioxidant defense system of tomato plants. *Indian Journal of Plant Physiology*.20 (3): 257-263.
- Khan, W., Prithiviraj, B., and Smith, D. L. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of plant physiology*.160 (8):859-863.
- Kim, F., Connor, S., Song, H., Kuykendall, T., and Yang, P. (2004). Platonic gold nanocrystals. *Angewandte Chemie*. 116(28): 3759-3763.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*. 46(1): 1-27.
- Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y. C., Braam, J., and Alvarez, P. J. (2010). Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry*: 29(3): 669-675.
- Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H., and Kweon, H. S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental toxicology and chemistry*.27 (9):1915-1921.
- León, J. M.M. Y G.J. Sepúlveda. (2012). El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas. *Interciencia*, 37(11), 805.

- Limpanavech, P., Chaiyasuta, S., Vongpromek, R., Pichyangkura, R., Khunwasi, C., Chadchawan, S., and Bangyeekhun, T. (2008). Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. *Scientia Horticulturae*.116 (1): 65-72.
- Lin, D., and Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 150(2): 243-250.
- López-Moreno, M. L., Avilés, L. L., Pérez, N. G., Irizarry, B. Á., Perales, O., Cedeno-Mattei, Y., and Román, F. (2016). Effect of cobalt ferrite ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) nanoparticles on the growth and development of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato plants). *Science of The Total Environment*. 550: 45-52.
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2010). X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of  $\text{CeO}_2$  nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. *Journal of agricultural and food chemistry*.58 (6): 3689-3693.
- Magán, J. J., Gallardo, M., Thompson, R. B., and Lorenzo, P. (2008). Effects of salinity on fruit yield and quality of tomato grown in soil-less culture in greenhouses in Mediterranean climatic conditions. *Agricultural water management*, 95(9), 1041-1055.

- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523.
- Misra, A. N., Misra, M., and Singh, R. (2013). Nanotechnology in agriculture and food industry. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*.16 (2): 1.
- Moghadam, M. M., and Motalleb, G. (2015). Nanoparticles and plant Biotechnology. *Research in Biotechnology*. 6(5):1-15.
- Mukherjee, A., Pokhrel, S., Bandyopadhyay, S., Mädler, L., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2014). A soil mediated phytotoxicological study of iron doped zinc oxide nanoparticles (Fe ZnO) in green peas (*Pisum sativum L.*). *Chemical Engineering Journal*. 258: 394-401.
- Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., and Varaldo, P. E. (1990). Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 34(10); 2019-2023.
- Nair, P. M. G., and Chung, I. M. (2015). Study on the correlation between copper oxide nanoparticles induced growth suppression and enhanced lignification in Indian mustard (*Brassica juncea L.*). *Ecotoxicology and environmental safety*. 113:302-313.

- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., and Kumar, D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant science*. 179(3): 154-163.
- Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 1981;22(5):867-880. Nekrasova, G. F., Ushakova, O. S., Ermakov, A. E., Uimin, M. A., and Byzov, I. V. (2011). Effects of copper (II) ions and copper oxide nanoparticles on *Elodea densa* Planch. *Russian journal of ecology*, 42(6), 458-463.
- Nhan, V.L., Y. Rui., X. Li., S. Liu and Y. Han. (2014). Uptake, transport, distribution and bio-effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles in Bt-transgenic cotton. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 50.
- Parida, A. K., and Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*. 60(3): 324-349.
- Pavani, T., Rao, K. V., Chakra, C. S., and Prabhu, Y. T. (2016). Synthesis and characterization of  $\gamma$ -ferric oxide nanoparticles and their effect on *Solanum lycopersicum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9373-9380.
- Peppas, N. A., and Khare, A. R. (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced drug delivery reviews*. 11(1): 1-35.

- Peralta-Videa, J. R., Hernandez-Viezcas, J. A., Zhao, L., Diaz, B. C., Ge, Y., Priester, J. H., and Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Cerium dioxide and zinc oxide nanoparticles alter the nutritional value of soil cultivated soybean plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 80: 128-135.
- Porra R.J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. (2002). *Photosynth Res*.73(1-3):149-156.
- Pradhan, S., Patra, P., Mitra, S., Dey, K. K., Basu, S., Chandra, S., and Goswami, A. (2015). Copper Nanoparticle (CuNP) Nanochain Arrays with a Reduced Toxicity Response: A Biophysical and Biochemical Outlook on *Vigna radiata*. *Journal of agricultural and food chemistry*.63 (10):2606-2617.
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., and 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.
- Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalho, G. S., and Oliveira, C. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil Environ*. 56(12): 584-588.
- Rao, S., and Shekhawat, G. S. (2014). Toxicity of ZnO engineered nanoparticles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific

accumulation in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2(1): 105-114.

Romero-Aranda, R., Soria, T., and Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160(2), 265-272.

SAGARPA (2005). Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p.

Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., and Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International journal of biological macromolecules*, 75, 346-353.

Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., and Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*. 17(2): 1-21.

Siddiqui, M. H., and Al-Whaibi, M. H. (2014). Role of nano-SiO<sub>2</sub> in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* seeds Mill.). *Saudi journal of biological sciences*. 21 (1): 13-17.

Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*.16:144-158.

- Somasundaran, P., Fang, X., Ponnurangam, S., and Li, B. (2010). Nanoparticles: characteristics, mechanisms and modulation of biotoxicity. *KONA powder and particle journal*. 28 (0): 38-49.
- Srilatha,B. (2011). Nanotechnology in Agriculture. *Journal Nanomedic Nanotechnology*. 2:123-128.
- Steiner, A.A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*. 15: 134-154.
- Trujillo-Reyes, J., Majumdar, S., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Exposure studies of core–shell Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard. *Journal of hazardous materials*. 267: 255-263.
- Uhram, S., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., and Lee, E. J. (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO<sub>2</sub> and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and environmental safety*. 93:60-67.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Wang, Q., Ma, X., Zhang, W., Pei, H., and Chen, Y. (2012). The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. *Metallomics*, 4(10), 1105-1112.

- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.
- Xue, T., Hartikainen, H., and Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*. 237(1): 55-61.
- Yurtseven, E., Kesmez, G. D., and Ünlükara, A. (2005). The effects of water salinity and potassium levels on yield, fruit quality and water consumption of a native central anatolian tomato species (*Lycopersicum esculentum*). *Agricultural Water Management*, 78(1), 128-135.
- Zhang, X. F., Dong, X. L., Huang, H., Liu, Y. Y., Wang, W. N., Zhu, X. G., ...and Lee, C. G. (2006). Microwave absorption properties of the carbon-coated nickel nanocapsules. *Applied Physics Letters*, 89(5), 053115.
- 1968 A. Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices 2,6 Dichloroindophenol Titrimetric Method. Off Method Anal Of AOAC Int. 2006; AOAC Offic(45.1.14):1-2.