

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Las Nanopartículas Metálicas de Óxido de Zinc Incrementan el Vigor y Compuestos Polifenólicos en Germinados de Calabaza

Por:

**RAQUEL REVILLA RESENDIZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Las Nanopartículas Metálicas de Óxido de Zinc Incrementan el Vigor y Compuestos Polifenólicos en Germinados de Calabaza

Por:

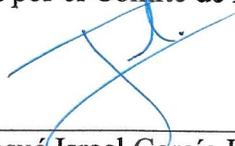
**RAQUEL REVILLA RESENDIZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Josué Israel García López  
Asesor Principal



Dr. Perpetuo Álvarez Vázquez  
Coasesor



Dra. Patricia Adriana De León Martínez  
Coasesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

## DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reforma de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



---

Raquel Revilla Resendiz

## AGRADECIMIENTOS

### **A mi Alma Terra Mater**

A mi gloriosa Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), por recibirme y darme la oportunidad de formarme como profesionista en esta enorme casa de estudios el cual se convirtió en mi segundo hogar y un lugar seguro para mí. Gracias a mi amada universidad por cobijarme durante este largo proceso, al brindarme comedor, transporte y lo más importante el aprendizaje deseado, gracias por darme las herramientas necesarias para afrontar los retos que en un futuro llegaran.

**A mis padres Graciela Resendiz y Ananías Revilla**, por todo su esfuerzo y apoyo incondicional, por siempre creer en mi y alentarme a ser una mejor persona.

**A mi asesor Dr. Josué Israel García López**, por todo su gran apoyo brindado durante todo el proceso de mi investigación de tesis ya que siempre estuvo dispuesto a ayudar y a aconsejar en cada paso de mi investigación, por su dedicación y paciencia en el desarrollo de mi proyecto de tesis

**AL Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo**, por compartir sus conocimientos, por ayudarme con sus consejos cada que los pedía, gracias por ser buen maestro y estar siempre brindándome su apoyo.

**AL Ing. Luis Antonio Torres Gutiérrez**, quien me inspiro y contagio el amor por la agronomía, por alentarme en esta noble profesión y compartir su amplio conocimiento.

**A mi tutora Sara Escude**, por hacer esta etapa más sencilla, me guió durante todo este viaje académico. Agradezco profundamente su apoyo incondicional, sus valiosos consejos y la confianza que depositó en mí.

**A B.W**, te agradezco infinitamente por haber estado conmigo en los momentos malos y buenos, por estar para mí y yo estar para ti, gracias por apoyarme en toda esta etapa universitaria y por formar parte de ella y por último gracias por los consejos y lecciones de vida que me brindaste en este tiempo.

**A mis amigos de la universidad**, que con su amistad y solidaridad hicieron que cada día en la universidad fuera más llevadero. Gracias por las conversaciones interminables, las risas y el apoyo incondicional que me brindaron. Este trabajo es un reflejo de nuestro esfuerzo y dedicación. A ustedes, que siempre me alentaron a seguir adelante, les dedico esta tesis."

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres**

Dedico de todo corazón esta tesis a mi madre Graciela Reséndiz Martínez y a mi padre Ananías Revilla puesto que sin ellos nada de esto lo hubiese lograda sin su gran apoyo incondicional que me brindaron durante toda mi vida, por siempre darme todo para salir adelante ya que todo lo que soy es gracias a ellos.

### **A mis hermanos**

Rocio, Ana patricia, Zayra, Saul Noe y Juan José a ustedes mis hermanos que nunca me dejaron sola y de alguna u otra manera estuvieron para mí para que yo saliera adelante durante todo este proceso de mi carrera.

### **A mis sobrinos**

Dedico esta tesis a mis sobrinos, Alejandro y Yolanda del Rocio, quienes han sido una fuente de inspiración y alegría en mi vida.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Hipótesis .....	2
1.2 Objetivo .....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Nanotecnología en la agricultura .....	3
2.2 Nanofertilización de cultivos .....	4
2.3 Absorción de nanofertilizantes y proteínas transportadoras .....	5
2.4 Ventajas de los nanofertilizantes .....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
3.1 Material genético .....	8
3.2 Fuentes de Zn.....	8
3.3 Tratamientos .....	8
3.4 Germinación de semillas y crecimiento de plántulas.....	8
3.5 Extracción y cuantificación de polifenoles .....	9
3.6 Capacidad antioxidante.....	10
3.7 Diseño experimental y análisis estadístico .....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1 Germinación por la aplicación de NPs a diferentes concentraciones .....	11
4.2 Concentración de fenoles y capacidad antioxidante en los germinados .....	12
4.3 Propiedades antioxidantes.....	14
5. CONCLUSIONES .....	15
6. LITERATURA CITADA.....	16

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para la germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	11
Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para la germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	13

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Germinación (a), plántulas anormales (b) y semillas sin germinar (c) en semillas de calabaza sometidos a NPs ZnO con concentraciones de 0 a 20 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones (n=4). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ). ..... 12
- Figura 2. Concentración de fenoles totales en plúmula (a) y radícula (b) en brotes de semillas de calabaza sometidos a a NPs ZnO con concentraciones de 0 a 20 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones (n=4). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ). ..... 13
- Figura 3. Capacidad antioxidante por DPPH en plúmula (a) y radícula (b) en brotes de semillas de calabaza sometidos a NPs ZnO con concentraciones de 0 a 20 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones (n=4). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ). ..... 14

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el impacto de nanopartículas metálicas de óxido de zinc (NPs ZnO) a diferentes concentraciones sobre la germinación y vigor de semillas de calabaza, también se determinó la concentración de polifenoles y la capacidad antioxidante en los brotes. Los materiales a base de Zn se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución y difracción electrónica de área. Posteriormente, se prepararon soluciones a concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup> y se aplicarán los tratamientos durante la imbibición de las semillas. Enseguida, la siembra se realizó en papel Anchor. Los resultados indican que los tratamientos aplicados con NPs ZnO afectaron la fisiología de la semilla, debido a que a 10 y 20 mg L<sup>-1</sup> disminuyó en 79.1 y 84.6% las plántulas anormales y semillas sin germinar. Para la concentración de fenoles totales, a 10 mg L<sup>-1</sup> se presentó un incremento del 33.5% en comparación con el testigo. En cuanto a las propiedades antioxidantes, se puede observar que para plúmula la mayor capacidad antioxidante fue a una concentración de 15 mg L<sup>-1</sup>, superando al testigo en 48.6%, mientras que para la radícula la mayor capacidad antioxidante se presentó a 20 mg L<sup>-1</sup>, con incrementos del 57.5% en comparación con el control. Los resultados permiten identificar una mejora en la germinación y vigor de semillas de calabaza por la aplicación de NPS ZnO, lo que también resultó en modificaciones de metabolitos secundarios en los brotes de los germinados.

**Palabras clave:** Germinados, nanotecnología, vigor, polifenoles, capacidad antioxidante.

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las prácticas agrícolas, una fertilización adecuada puede contribuir al incremento de la concentración de micronutrientes en las partes comestibles de las plantas y con esto contrarrestar la deficiencia de Zn en animales, humanos y plantas (Butt et al., 2020). Ya que, dentro de los sistemas biológicos, el Zn juega un papel importante en procesos como en la síntesis de proteínas, y el ADN, además ayuda al sistema inmunológico a combatir bacterias y virus. Pero además interviene en procesos fisiológicos que se llevan a cabo en las plantas como la fotosíntesis, síntesis proteica y de fitohormonas, integridad de las membranas celulares, vigor de la plántula, formación de azúcares y defensas contra factores de estrés abióticos, como sequías y enfermedades; por lo tanto, la deficiencia de Zn en los cultivos reduce tanto su valor nutrimental como el rendimiento (Kalisz et al., 2021). De los métodos agronómicos para lograr la biofortificación de alimentos, la impregnación de semillas con suspensiones de nanopartículas podría implicar un método fácil y viable para mejorar la concentración de micronutrientes de interés alimentario en germinados (Preciado-Rangel et al., 2022). No obstante, la mayoría de los estudios de fertilización con nanofertilizantes se ha realizado para mejorar las respuestas agronómicas y antioxidantes de hortalizas (Gupta et al., 2016).

En el mercado existen varias fuentes de Zn, y vienen en múltiples formas, incluyendo sales inorgánicas, nanopartículas y formas quelatadas. El sulfato de Zn ( $ZnSO_4$ ) es la sal más popular porque es relativamente barata, muy soluble y ampliamente disponible (García-Gómez et al., 2017), sin embargo, se ha documentado que este compuesto presenta alta solubilidad con baja eficiencia para ser absorbido en los tejidos de la planta (Gupta et al., 2016). Además, las investigaciones han demostrado que la velocidad a la que las plantas absorben el Zn varía en función del tipo de Zn aplicado (Poudel et al., 2023). Por esto, es de suma importancia trabajar con nuevas tecnologías que permitan lograr una fertilización más eficiente del Zn en la producción de alimentos. Considerada como una tecnología emergente, la nanotecnología a través del uso de nanopartículas (1-100 nm) aplicadas como nanofertilizantes en cultivos, permite una mejor absorción y asimilación de nutrientes específicos como el Zn, esto en comparación con la fertilización común ya que el suministro

de nutrientes se da en forma gradual y controlada con el fin de incrementar el contenido de minerales de manera puntual (García-López et al., 2019). En este caso, la utilidad de las nanopartículas durante la imbibición de las semillas podría ser una opción excelente para la biofortificación de nutrientes, ya que se consumen en una fase temprana de la plántula y los nutrientes pueden translocarse rápidamente de la semilla al germinado. Sin embargo, es necesario investigar para definir la concentración óptima nutrientes y la fuente de fertilizantes para la biofortificación de germinados. En atención a lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el impacto que tienen las nanopartículas metálicas de Zn a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>), sobre las respuestas fisiológicas y bioquímicas antioxidantes en germinados de calabaza.

### **1.1 Hipótesis**

H<sub>i</sub>: La aplicación de nanopartículas metálicas de ZnO a concentraciones 0, 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>, durante la imbibición de semillas de calabaza modificará las respuestas fisiológicas y bioquímicas antioxidantes de los germinados.

H<sub>0</sub>: La aplicación de nanopartículas metálicas de ZnO a concentraciones 0, 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>, durante la imbibición de semillas de calabaza no influirá sobre las respuestas fisiológicas y bioquímicas antioxidantes de los germinados.

### **1.2 Objetivo**

Determinar el impacto de nanopartículas metálicas de Zn a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>), sobre las respuestas fisiológicas y bioquímicas antioxidantes en germinados de calabaza.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Nanotecnología en la agricultura

La nanotecnología con el uso de nanopartículas (NPs), está proporcionando avances en las estrategias de nutrición de las plantas, control de enfermedades y la conservación de agroalimentos (Uresti-Porras et al., 2021). Las nanopartículas metálicas como el óxido de zinc (NPs ZnO), se utilizan para complementar la fertilidad del suelo y el manejo preciso de los nutrimentos para una producción agrícola sostenible (Davarpanah et al., 2018), ya que el zinc (Zn) juega un papel importante en el funcionamiento de las plantas, como regulador de auxinas mediante la síntesis de triptófano y es requerido en la biosíntesis de proteínas y el metabolismo de los carbohidratos, además desempeña un papel importante en la expresión de genes relacionados con el estrés ambiental (Narendhran et al., 2016).

Las plantas expuestas a micronutrientes basados en NPs absorben más nutrientes que las plantas expuestas a las formas tradicionales de fertilizantes, lo que resulta en mejoras del proceso de fotosíntesis, el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Sharifan et al. 2021). Por ejemplo, un estudio realizado en arboles de granada (*Punica granatum* cv. Ardestani) mostró que la fertilización foliar con cantidades relativamente bajas de nanofertilizantes de Zn y B modificó el rendimiento, mejoró la calidad de la fruta, aumentó los azúcares del jugo y el índice de madurez (Davarpanah et al., 2016). Otra investigación indica que la fertilización de plantas con NPs ZnO mejoró las propiedades fisicoquímicas en frutos de chile habanero, con incrementos significativos en la concentración de capsaicinoides (García-López et al., 2019). Además del beneficio de las NPs para el crecimiento de las plantas, estudios recientes han demostrado que las NPs tienen un gran potencial para aumentar la vida útil de los alimentos frescos debido a su comportamiento antimicrobiano (Biswas et al. 2020). En un estudio sobre la vida útil de frutos de fresa, la exposición de nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) al 0.5% redujo la población microbiana en un 8% log CFU g<sup>-1</sup> durante el almacenamiento en frío, peso fresco conservado, firmeza sostenida y mayor actividad antioxidante en comparación con el control (Sogvar et al. 2016).

Si bien, los enfoques del uso de NPs ZnO para la nutrición de plantas y mejoras significativas de la vida de anaquel de frutas y hortalizas se reportan como métodos exitosos.

En este sentido, se necesitan ensayos de pruebas que indiquen cuales son los cambios fisiológicos y bioquímicos que generan las NPs ZnO durante la germinación y el crecimiento de plántulas, a fin de garantizar que las prácticas del uso de nanomateriales durante un sistema productivo, no comprometen el establecimiento temprano de plántulas.

## **2.2 Nanofertilización de cultivos**

Cuando los cultivos crecen en suelos en los que los elementos minerales son deficientes y/o no se translocan fácilmente a los tejidos comestibles, se aplican fertilizantes inorgánicos solubles a las raíces o a las hojas. Sin embargo, se ha documentado que la eficiencia de absorción de microminerales en los tejidos de la planta varía en función del tipo de fertilizante aplicado, lo que está asociado con la solubilidad del mismo (Zhiyuan et al., 2021). Por esto, el uso de nanofertilizantes minerales es evidentemente factible para la nutrición de cultivos, ya que estos materiales en la fertilización agronómica presentan una liberación lenta y gradual del ingrediente activo, por ello, consideramos que la impregnación de semillas es una forma sencilla y barata de producir germinados biofortificados, pero requiere una atención especial en cuanto a fuente de nutrientes, método de aplicación y efectos en el medio ambiente.

Como lo ejemplifica Poudel et al. (2023), demostrando que la impregnación de semillas de frijol y girasol con nanofertilizantes de Zn permitió enriquecer los brotes con este micronutriente, sin embargo, mencionaron que la concentración óptima de la solución fertilizante de Zn debe seleccionarse en función de la fuente de fertilizante, la especie objetivo y el Zn deseado. Del mismo modo, el enriquecimiento de las plántulas de arroz en germinación con nanofertilizantes de Zn aumentó la concentración de este elemento en el arroz hasta 15.6 veces más que el control (Yuan et al., 2013). Las mejoras en la concentración de microelementos se debe a que el Zn puede liberarse lenta y continuamente de las nanopartículas de óxido de zinc (NPS ZnO) (Kopittke et al., 2019). En regiones con suelos

potencialmente deficientes en Zn, la aplicación de nanofertilizantes a base de zinc ha reducido las deficiencias de este elemento, además de su biodisponibilidad al reducir factores antinutrientes como el ácido fítico (Naseeruddin et al., 2018). La aplicación de materiales a nanoescala en la agricultura tiene por objeto, en particular, reducir las aplicaciones de productos fitosanitarios, minimizar las pérdidas de nutrientes en la fertilización y aumentar el rendimiento mediante una gestión optimizada de los nutrientes. Considerando lo anterior, estas tecnologías deben estar disponibles a un coste relativamente bajo y también deben proporcionar análisis rápidos de Zn para facilitar un fenotipado de alto rendimiento. Además, deberá prestarse la máxima atención a la manipulación de las muestras de semillas destinadas a la evaluación del Zn. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es lograr la biofortificación de nutrientes como el Zn en germinados de cebada a través de nutrientes a nanoescala junto con un mayor aporte nutricional y nutracéutico.

### **2.3 Absorción de nanofertilizantes y proteínas transportadoras**

Numerosos canales iónicos y proteínas transportadoras residen en la membrana plasmática y funcionan para mediar la translocación de sustancias específicas dentro o fuera de la célula. Estos poros acuosos pueden permitir un flujo rápido de moléculas a través de la membrana plasmática. Sin embargo, el nivel de selectividad es muy riguroso, por lo tanto, hay una baja probabilidad de apertura y los tamaños de poro son extremadamente pequeños, esto impide la entrada de las NPs, considerando lo anterior esta vía es poco factible. Es importante considerar, que la internalización celular de NPs debe enfrentar los desafíos de los principios básicos de la fisiología de las plantas (Corredor *et al.*, 2009). Se han observado daños en las membranas con la preintración celular de nanotubos de carbono, debido a que es una penetración destructiva que puede inducir muerte celular (Jitao, 2018).

Los nanomateriales puedan remodelar o modificar la estructura de las membranas y las paredes celulares de las plantas (Liu *et al.*, 2013). Numerosos investigadores han demostrado que tanto el carbono como los NPs metálicos pueden producir estrés en las plantas, generando un exceso de ROS que pueden afectar las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y el ADN. Las NPs alteran la eficiencia fotosintética, la fluorescencia fotoquímica y el rendimiento

cuántico en las plantas, debido a sus interacciones con los fotosistemas I y II, ya que las investigaciones han demostrado que las clorofilas transfieren la energía a las NPs (Olejnik *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2015).

## **2.4 Ventajas de los nanofertilizantes**

Dentro de las prácticas agrícolas, una fertilización adecuada puede contribuir al incremento de la concentración de micronutrientes en las partes comestibles de las plantas y con esto contrarrestar la deficiencia de Zn en animales, humanos y plantas (Almendros *et al.*, 2014). Ya que, dentro de los sistemas biológicos, el Zn juega un papel importante en procesos como en la síntesis de proteínas y el ADN, además ayuda al sistema inmunológico a combatir bacterias y virus. Pero además interviene en procesos fisiológicos que se llevan a cabo en las plantas como la fotosíntesis, síntesis proteica y de fitohormonas, integridad de las membranas celulares, vigor de la plántula, formación de azúcares y defensas contra factores de estrés abióticos, como sequías y enfermedades; por lo tanto, la deficiencia de Zn en los cultivos reduce tanto su valor nutricional como el rendimiento (Almendros *et al.*, 2014). No obstante, en los suelos agrícolas un problema recurrente es la disponibilidad de Zn para ser absorbido por las plantas, por lo que se utiliza  $ZnSO_4$  como fertilizante para contrarrestar las deficiencias, sin embargo, se ha documentado que este compuesto presenta alta solubilidad con baja eficiencia para ser absorbido en los tejidos de la planta (Gupta *et al.*, 2016).

Por esto, es de suma importancia trabajar con nuevas tecnologías que permitan lograr una fertilización más eficiente del Zn en la producción de alimentos. Considerada como una tecnología emergente, la nanotecnología a través del uso de nanopartículas (1-100 nm) aplicadas como nanofertilizantes en cultivos, permite una mejor absorción y asimilación de nutrientes específicos como el Zn, esto en comparación con la fertilización común ya que el suministro de nutrientes se da en forma gradual y controlada con el fin de incrementar el contenido de minerales de manera puntual (García-López *et al.*, 2019). En este contexto, dentro de los métodos agronómicos para la biofortificación, la impregnación de semillas con suspensiones de nanopartículas es un método fácil para mejorar la concentración de micronutrientes de interés alimentario en germinados (Preciado-Rangel *et al.*, 2022). No

obstante, la mayoría de los estudios de fertilización con nanopartículas se ha realizado para mejorar las respuestas agronómicas y antioxidantes de hortalizas (Gupta et al., 2016).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material genético**

La variedad de semilla de calaza fue Grey Zucchini (KristenSeeds®), es una planta de clima caliente, la fruta es de un tamaño uniforme, con un tamaño de 13 a 20 cm de longitud y un color grisáceo verde. La duración del ciclo es de 42 días en promedio.

#### **3.2 Fuentes de Zn**

Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) se adquirieron en Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, USA). Las NPs ZnO tienen un porcentaje de Zn y O 82.8 % y 17.18 %, respectivamente. De acuerdo al peso molecular de cada elemento, el porcentaje teórico esperado para Zn y O es de 80.3 % y 19.7 % (García-López et al., 2019).

#### **3.3 Tratamientos**

Las NPs ZnO se prepararon en solución madre de 100 mg L<sup>-1</sup>, preparada en agua desionizada estéril y dispersada con un sonicador de sonda (Q500-110, Qsonica, Newtown, CT, USA), durante 25 min. La suspensión se diluyó y se usaron muestras de 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>, además de un control absoluto (agua destilada).

#### **3.4 Germinación de semillas y crecimiento de plántulas**

Las semillas se contaron en lotes de 100 por tratamiento, se usaron pinzas de disección para colocar las semillas en recipientes de tereftalato de polietileno de 15 cm y 20 cm. Los tratamientos se aplicaron una vez durante la etapa de imbibición (12 h) con una pipeta (PIPETMAN Classic 1–10mL, Gilson, Middleton, WI, EE. UU.), dónde se agregaron diez mililitros de suspensión de NPs ZnO a las concentraciones mencionadas anteriormente para cada tratamiento. Las semillas se colocaron durante 12 h en una cámara de prueba (Equitek EGCS 3S, 301 3SHR, Equitek, Guadalajara, Mexico) a 25 °C ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Una vez que se completó el período de imbibición de la

semilla, se plantaron cuatro réplicas de 25 semillas por tratamiento en papel Anchor (Seedburo Equipment Company, Hidalgo, TX, USA). El papel de Anchor se humedeció con agua destilada, luego se colocaron 25 semillas horizontalmente sobre el papel, cuidando que el embrión de semillas se ubicara hacia abajo; luego se humedeció otro papel del mismo tamaño para cubrir las semillas. Posteriormente, se plegaron en un rollo de 4 cm de ancho, se colocaron en cestas de tereftalato de polietileno de 20 cm de ancho y 45 cm de alto, y se volvieron a colocar en la cámara de prueba durante 7 días.

Una vez obtenidos los germinados, se determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de germinación, plántulas anormales y semillas sin germinar. Posteriormente, se procedió a separar cada parte de las estructuras cortando con un bisturí plúmula, radícula y cariósido, luego se llevaron a congelación para la acumulación de germinados, una vez obtenida una cantidad considerable de muestras (10 g), se sometieron a secado en una estufa a 50 °C durante 48 h. Posteriormente las muestras secas se molieron con un molino eléctrico pulverizador Goldenwall HC-500 (Xia Cheng, Zhejiang, CHN), la harina se tamizó para obtener partículas de 0.50 mm (malla estándar 35), la cual se utilizó para los análisis bioquímicos.

### **3.5 Extracción y cuantificación de polifenoles**

De la harina que fue tamizada, se tomaron 0.3 g de muestra y se mezclaron con 3 mL de metanol al 80 % en un tubo de cultivo de tapón de rosca y se agitaron durante 1 h a 200 rpm. Enseguida, las muestras se centrifugaron a 4500 rpm, los sobrenadantes se recuperaron y almacenaron en -20 °C hasta que fueron utilizados para el análisis fenólico y de capacidad antioxidante. Se tomaron 0.2 mL del extracto y se añadieron 2.6 mL de agua destilada y 0.2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después, se dejaron reposar durante 5 min y posteriormente se agregaron 2 mL de carbonato de sodio (al 7 % a la solución agitando durante 30 s). La solución se colocó en oscuridad durante 90 min, y posteriormente se midió la absorbancia a 750 nm. El contenido total de fenoles se expresó en miligramos de ácido gálico equivalente por kilogramo de muestra (mg GAE kg<sup>-1</sup>), calculado a partir de la curva de calibración del ácido gálico de 0 a 200 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.6 Capacidad antioxidante**

Los ensayos para determinar la capacidad antioxidante se realizaron de acuerdo con Rodríguez-Salinas et al. (2020). La capacidad antioxidante de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se evaluó utilizando una solución de trabajo 60  $\mu\text{M}$  en metanol al 80 %, con una absorbancia ajustada a 0.7 a 517 nm. El ensayo se llevó a cabo mezclando 50  $\mu\text{L}$  del extracto fenólico con 1.5 mL de la solución de trabajo DPPH, la reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad y se determinó la absorbancia.

### **3.7 Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones; el modelo lineal general fue  $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$ , donde la variable de respuesta es  $Y_{ij}$ ,  $\mu$  el promedio general,  $\alpha_i$  el efecto de las concentraciones de NPs ZnO y  $e_{ij}$  el error experimental. La unidad experimental consistió en un rollo de papel Anchor que contenía 25 semillas de calabaza.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Germinación por la aplicación de NPs a diferentes concentraciones

Los resultados indican que la fuente de variación concentración afectó significativamente la germinación y el número de plántulas anormales (Cuadro 1). El efecto ya sea positivo o negativo se presentará en el siguiente apartado de comparación de medias.

**Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para la germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn.**

FV	GL	Germinación (%)	PA (%)	SSG (%)
Concentraciones	4	1050.37*	565.18**	157.03**
Error	25	386.37	50.66	47.70
C.V.		25.12	60.43	100.25

\*, \*\*= Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente; FV= Fuentes de variación; GL= Grados de libertad; PA= Plántulas anormales; SSG= Semillas sin germinar; C.V= Coeficiente de variación.

La germinación obtuvo los mejores resultados a concentraciones de 10 y 20 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1), lo que resultó en disminuciones del 79.1 y 84.6% en plántulas anormales y semillas sin germinar. Algunos estudios han documentado que la aplicación de iones en forma de NPs promueve la germinación de semillas de mijo a concentraciones de 0.2 de ml (*Pennisetum glaucum*), los incrementos fueron de un 48% con respecto al control. Otro estudio demostró que la impregnación de semillas de pimiento con NPs ZnO a 100 mg L<sup>-1</sup> permitió los mejor resultados para los parámetros de crecimiento temprano, así como para la altura de la planta, el diámetro del tallo, el área foliar y la clorofila total (García-Guadalupe et al., 2023). El efecto ya sea negativo o positivo de las NPs en las semillas y crecimiento de plántulas se debe a la adhesión facilitada a la superficie, la absorción, la translocación y la interacción de

los ingredientes activos en las nanopartículas con los componentes celulares que favorecen el crecimiento y rendimiento de cultivos y plantas (Begum y Jayawardana, 2023).

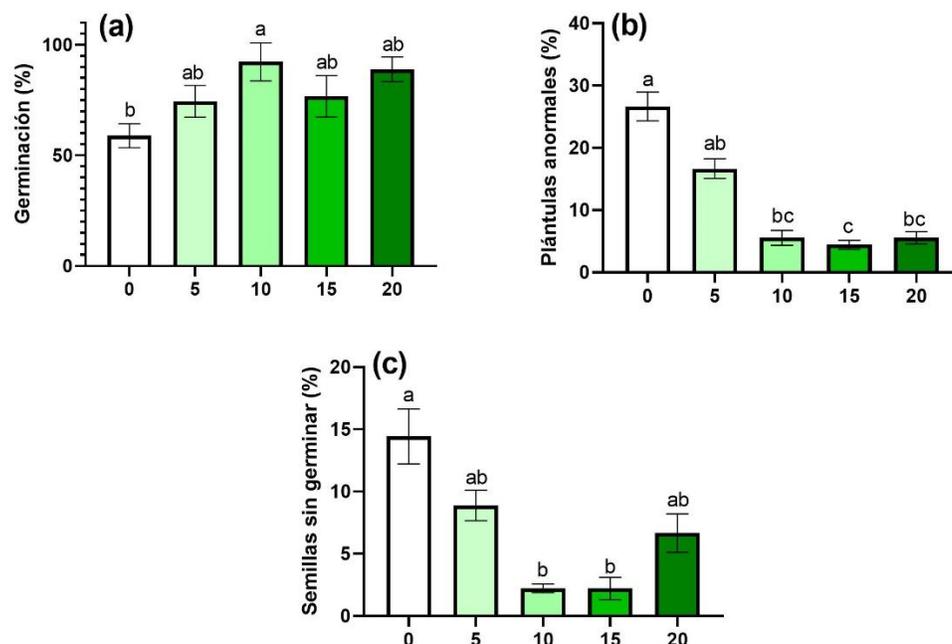


Figura 1. Germinación (a), plántulas anormales (b) y semillas sin germinar (c) en semillas de calabaza sometidos a NPs ZnO con concentraciones de 0 a 20 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones (n=4). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

#### 4.2 Concentración de fenoles y capacidad antioxidante en los germinados

Según el ANOVA para polifenoles, la concentración de estos metabolitos secundarios y las propiedades antioxidantes de los brotes de los germinados se vieron modificados por la aplicación de NPs ZnO (Cuadro 2). Además de las mejoras en la germinación, los resultados de este estudio permiten verificar un incremento de la concentración de polifenoles, esto se explicará a detalle en la comparación de medias (Figura 2 y 3).

**Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para la germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn.**

FV	GL	Fenoles plúmula (mg GAE/100 g)	Fenoles radícula (mg GAE/100 g)	DPPH plúmula μmol TE/100 g	DPPH radícula μmol TE/100 g
Concentraciones	4	149833.52*	10642.54*	612451.66*	228814.16*
Error	10	41018.51	4101.18	129128.33	28951.66
C.V.		15.34	11.27	19.48	20.88

\*, \*\*= Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente; FV= Fuentes de variación; GL= Grados de libertad; C.V= Coeficiente de variación.

En cuanto a la concentración de fenoles totales para la plúmula, a 10 mg L<sup>-1</sup> se presentó un incremento del 33.5% en comparación con el testigo, además es importante mencionar que todas las concentraciones fueron estadísticamente superiores al control (Figura 2a). En cuanto a los fenoles de la radícula, las concentraciones a 5 y 20 L<sup>-1</sup> presentaron incrementos del 8 y 4.2 % en comparación con el control, respectivamente (Figura 2b).

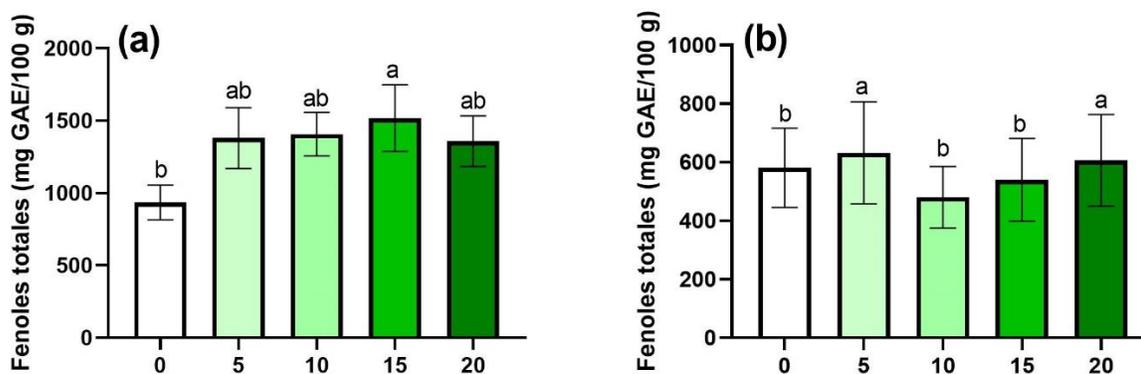


Figura 2. Concentración de fenoles totales en plúmula (a) y radícula (b) en brotes de semillas de calabaza sometidos a a NPs ZnO con concentraciones de 0 a 20 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones (n=4). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

### 4.3 Propiedades antioxidantes

En cuanto a las propiedades antioxidantes, se puede observar que para plúmula la mayor capacidad antioxidante fue a una concentración de 15 mg L<sup>-1</sup>, superando al testigo en 48.6%, mientras que para radícula fue a 20 mg L<sup>-1</sup> fueron incrementos del 57.5% (Figura 3a y b).

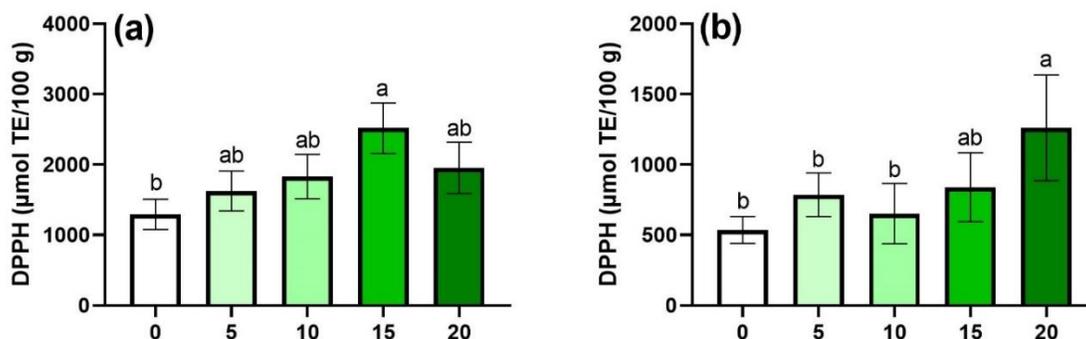


Figura 3. Capacidad antioxidante por DPPH en plúmula (a) y radícula (b) en brotes de semillas de calabaza sometidos a NPs ZnO con concentraciones de 0 a 20 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones (n=4). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

En general, los resultados de este estudio indican que las NPs ZnO modificaron la germinación de semillas y la acumulación de metabolitos secundarios de las plantas. Estos resultados son consistentes con estudios previos, donde reportaron que la aplicación de NPs ZnO a 25 mg L<sup>-1</sup> Ginkgo biloba incrementó el contenido de flavonoides en 16,7% en comparación con el grupo de control. Sin embargo, cuando se trataron con 50 mg/L y 100 mg/L de ZnO-NPs, el contenido total de flavonoides de las hojas de G. biloba disminuyó un 7,2% y un 11,1%, respectivamente (Javed et al., 2015). La toxicidad potencial de las NPs ZnO en elevadas concentraciones puede inhibir el aumento del contenido total de flavonoides, ya que estos metabolitos son antioxidantes activos en sistemas biológicos y probablemente en plantas sometidas a nanofertilizantes disminuyen debido a su actividad al estabilizar radicales libres para disminuir el estrés oxidativo que pueden generar a nivel celular (Wang et al., 2023).

## 5. CONCLUSIONES

La aplicación de nanopartículas de NPs ZnO promovió positivamente la germinación de semillas de calabaza, por ende, disminuyó el número de plántulas anormales y semillas sin germinar en comparación con el control. Además, se observó un incremento de polifenoles en los brotes (plúmula y radícula), esto posiblemente debido al estrés oxidativo que generan las NPs ZnO a nivel celular, lo que generó una mayor acumulación de compuestos antioxidantes.

## 6. LITERATURA CITADA

- Almendros, A., López, L., and Sánchez, R. 2014. Proper fertilization as a strategy to increase the concentration of micronutrients in plants and combat zinc deficiency in humans and animals. *Journal of Agriculture and Nutrition*, 25(4), 210-220.
- Butt, B. Z., and Naseer, I. 2020. Nanofertilizers. *Nanoagronomy*, 125-152.
- Corredor, D., Pérez, J., and Rodríguez, M. 2009. Internalización celular de nanopartículas y su impacto en la fisiología de las plantas. *Revista Internacional de Nanotecnología en Agricultura*, 15(4), 250-265.
- Davarpanah, S., Tehranifar, A., Davarynejad, G., Abadía, J., and Khorasani, R. 2018. Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. *Ardestani*) fruit yield and quality. *Scientia horticulturae*, 210, 57-64.
- Estrada-Arellano, K. L., Vázquez-Vázquez, C., Betancourt-Galindo, R., Muy-Rangel, M. D., Valenzuela-Nuñez, L. M., García-Hernández, J. L., and Gallegos-Robles, M. Á. 2023. Foliar fertilization with ZnO nanoparticles and its effect on production, biophysical and nutraceutical quality in pecan walnut fruits (*Carya illinoensis*). *Terra Latinoamericana*, 41.
- Fernández, S. D., de Agroquímica, G., Pérez, E. H., Páez, J. E. R., Zambrano, O. D. B., and Diversidad, G. D. E. S. Nanofertilizers: opportunities for sustainable agriculture. *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca Popayán*, 2024, 355.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., and Fernández, M. D. 2017. Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO<sub>4</sub> in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Science of the Total Environment*, 589, 11-24.
- García-López, J. I. 2019. Physiological and biochemical responses induced by ZnO nanoparticles in seeds and plants of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq) (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- García-López, J. I., Niño-Medina, G., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldivar, R. H., Barriga-Castro, E. D., Vázquez-Alvarado, R., ... and Zavala-García, F. 2019. Foliar application of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate boosts the content of bioactive compounds in habanero peppers. *Plants*, 8(8), 254.
- García-López, J., Pérez, M., and González, L. 2019. Application of nanoparticles as nanofertilizers to improve nutrient absorption in crops: Effects of zinc compared to conventional fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(12), 3489-3497.

- Gupta, N., Ram, H., and Kumar, B. 2016. Mechanism of zinc absorption in plants: absorption, transport, translocation and accumulation. *Journals in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(1), 89–109. DOI:10.1007/S11157-016-9390.
- Gupta, N., Ram, H., and Kumar, B. 2016. Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 89-109.
- Gupta, R., Sharma, P., and Singh, R. 2016. Effects of nanoparticles as fertilizers on the agronomic and antioxidant responses of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 1023-1031.
- Henriquez-Alegría, A., and Asmat-Campos, D. 2023. The challenge of nanotechnology in the field of agricultural applications: Nanofertilizers as an emerging technology. *LACCEI*, 1(8).
- Itao, A. 2018. Effects of carbon nanotubes on cell membranes and the induction of cell death. *Journal of Nanotechnology and Cell Biology*, 12(3), 215-229.
- Kalisz, A., Húska, D., Jurkow, R., Dvořák, M., Klejdus, B., Caruso, G., and Šekara, A. 2021. Nanoparticles of cerium, iron, and silicon oxides change the metabolism of phenols and flavonoids in butterhead lettuce and sweet pepper seedlings. *Environmental Science: Nano*, 8(7), 1945-1959.
- Kopittke, P. M., Smith, E., and Menzies, N. W. 2019. Nanotechnology in agriculture: New opportunities for improving crop production and food security. *Nature Sustainability*, 2(3), 109-121.
- Liu, X., Zhang, Y., and Wang, H. 2013. Effects of nanomaterials on plant cells and their interaction with cell membranes and walls. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), 123-134.
- López-Martínez, G., Ruiz-Torres, N., Diaz-Barriga-Castro, E., Lira-Saldívar, R. H., López Hernández, I., Luna Anguiano, J., and Flores-Hernández, E. A. 2023. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on the development and germination of *Cucumis sativus* L. *Ecosystems and agricultural resources*, 10(SPE3).
- Narendhran, S., Rajiv, P., and Sivaraj, R. A. 2016. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth of *Sesamum indicum* L. in zinc deficient soil. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8(3), 365-371.
- Naseeruddin, R., Sumathi, V., Prasad, T. N., Sudhakar, P., Chandrika, V., and Ravindra Reddy, B. 2018. Unprecedented synergistic effects of nanoscale nutrients on growth, productivity of sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L.)], and nutrient biofortification. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(5), 1075-1084.

- Olejnik, A., Kowalska, E., and Nowak, M. 2013. Effect of nanoparticles on photosynthesis and fluorescence in plants. *Environmental Science and Technology*, 47(12), 6582-6590.
- Poudel, P., Di Gioia, F., Lambert, J. D., and Connolly, E. L. 2023. Zinc biofortification through seed nutri-priming using alternative zinc sources and concentration levels in pea and sunflower microgreens. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1177844.
- Preciado-Rangel, P., Martínez-Téllez, M. A., and González-Morales, S. 2022. Use of nanoparticles for seed biofortification: Improvement in the concentration of micronutrients in sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(12), 3456-3464.
- Preciado-Rangel, P., Valenzuela-García, A. A., Pérez-García, L. A., González-Salas, U., Ortiz-Díaz, S. A., Buendía-García, A., and Rueda Puente, E. O. 2022. Foliar biofortification with iron improves nutraceutical quality and antioxidant capacity in lettuce. *Terra Latinoamericana*, 40.
- Sharifan, H., Sabzalian, M. R., and Mahmoudi, S. 2021. Effects of nanoparticle-based micronutrients on nutrient uptake and crop yield: Comparison with traditional fertilizers. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 184(4), 512-522.
- Sogvar, O. B., Saba, M. K., Emamifar, A., and Hallaj, R. 2016. Influence of nano-ZnO on microbial growth, bioactive content and postharvest quality of strawberries during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 168-176.
- Uresti-Porras, L. L., García, J. A., and Martínez, R. 2021. Applications of nanotechnology in agriculture: Advances in plant nutrition, disease control and food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(8), 2174-2185.
- Zhao, A., Yang, S., Wang, B., Tian, X., Zhang, Y. 2018. Effects of ZnSO<sub>4</sub> and zn-EDTA emitted or grouped to the soil on the bioavailability of zn in the fractions of wheat (*Triticum aestivum* L.) and Zn in the soil. *Chemosphere* 205, 350–360. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.11.