

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



BIOFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS DE CEBADA CON NANOMATERIALES  
DE ZnO

Tesis

Que presenta ROCÍO MARLEN RAMÍREZ LÓPEZ

como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS

Saltillo, Coahuila

Marzo, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



BIOFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS DE CEBADA CON NANOMATERIALES  
DE ZnO

Tesis

Que presenta ROCÍO MARLEN RAMÍREZ LÓPEZ

como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS

  
Dr. Josué Israel García López  
Director de Tesis

  
Dr. Guillermo Niño Medina  
Co-Director de Tesis

  
Dr. Antonio Flores Naveda  
Subdirector de Postgrado

UAAAAN

Saltillo, Coahuila

Marzo, 2025

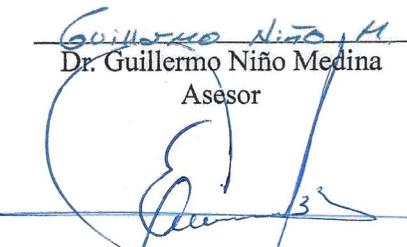
BIOFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS DE CEBADA CON NANOMATERIALES  
DE ZnO

Tesis

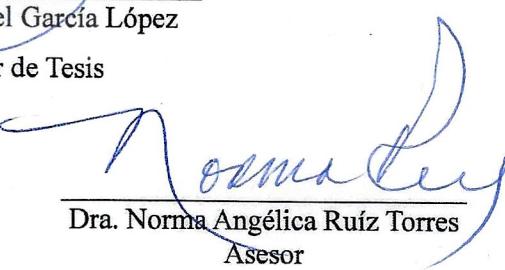
Elaborada por ROCÍO MARLEN RAMÍREZ LÓPEZ como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Tecnología de Granos y Semillas con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.

  
Dr. Josué Israel García López

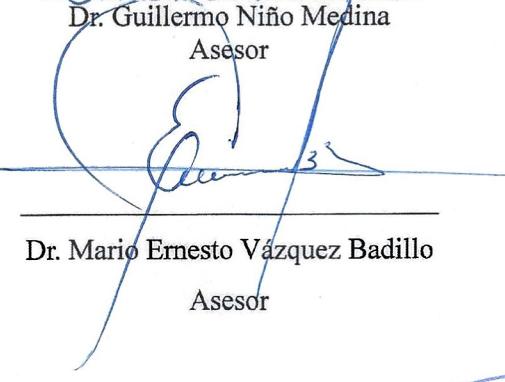
Director de Tesis

  
Dr. Guillermo Niño Medina

Asesor

  
Dra. Norma Angélica Ruiz Torres

Asesor

  
Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Asesor

  
Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón

Asesor

  
Dr. Antonio Flores Naveda

Subdirector de Postgrado

UAAAAN

Saltillo, Coahuila

Marzo, 2025

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a Dios por darme la fortaleza y nunca soltarme de la mano en todo momento para poder llegar a este logro. A mi familia, que siempre ha creído en mí y me ha brindado su amor y apoyo. En especial, agradezco a mi esposo Christian Badillo y a mis hijos Regina, Esaú y Hugo por su paciencia y comprensión durante este tiempo.

Quiero agradecer a mis papás, mi suegra, mis hermanos, familia y amigos por sus palabras de aliento, consejos y apoyo moral. Cada uno de ustedes ha sido una fuente de inspiración y motivación.

Al Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAAN) por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. Este apoyo permitió realizar este trabajo con mayor eficacia.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Agradezco también a mi querida Alma Mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAAN), por abrirme sus puertas para realizar mis estudios desde Ingeniería hasta postgrado.

A mi director de tesis, Dr. Josué García López, por su constante apoyo, orientación y paciencia durante todo este proceso. Su conocimiento y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Agradezco también a mis asesores, Dra. Norma Ruiz Torres, Dr. Mario Vázquez Badillo, Dra. Sonia Ramírez Barrón y Dr. Guillermo Niño Medina, por sus valiosas sugerencias y su apoyo incondicional.

Gracias a todos los que, de una u otra forma, hicieron posible este logro.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo con todo mi cariño a mis hijos Regina, Esaú y Hugo, pues cada paso que he dado en este camino ha sido inspirado por el amor que les tengo. Ustedes son mi mayor motivación y la razón por la que nunca dejaré de luchar por mis sueños y los de ustedes. Gracias por su paciencia, por su comprensión y por darme fuerza en los momentos más difíciles. Este logro es tan suyo como mío, porque ustedes siempre han estado a mi lado, brindándome el apoyo y el amor que solo unos hijos tan maravillosos pueden ofrecer.

A mi querido esposo Christian, te dedico esta tesis como resultado de todo el esfuerzo que juntos realizamos día con día, gracias por tu apoyo y tu paciencia. En cada momento de dificultad, tú fuiste mi refugio, dándome fuerzas para continuar. Tu comprensión, motivación y ánimo me han impulsado a seguir adelante, incluso cuando los desafíos parecían insuperables. Te dedico este trabajo con todo mi amor.

Dedico este trabajo también a mis padres, hermanos y a mi suegra que han estado a mi lado en todo momento y me han impulsado a seguir adelante. Y a todos aquellos que, de alguna manera, me han inspirado a seguir mis sueños y a nunca rendirme.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	iv
<b>DEDICATORIA .....</b>	v
<b>ÍNDICE GENERAL .....</b>	vi
<b>RESUMEN.....</b>	xi
<b>ABSTRACT .....</b>	xiii
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	1
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVO .....</b>	3
Hipótesis alterna.....	3
Hipótesis nula .....	3
Objetivo general .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	4
Nanofertilizantes de ZnO en la impregnación de semillas .....	4
Biofortificación de plantas con el uso de nanomateriales de Zn .....	5
Impacto de los nanofertilizantes de ZnO en metabolitos secundarios de las plantas	6
Biosíntesis de compuestos primarios en las plantas por la aplicación de nanofertilizantes de ZnO .....	7
Desarrollo de productos funcionales a partir de plantas sometidas a ZnO .....	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	10
Sitio experimental y material genético .....	10
Fuentes y caracterización de materiales de Zn.....	10
Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO .....	10
Síntesis de GNPZnO mediante química verde.....	10
Caracterización de los nanomateriales de ZnO .....	11
Curva de imbibición y tiempo de exposición a las soluciones/suspensiones con Nanopartículas (NPs) .....	11
Preparación y aplicación de tratamientos.....	12
Siembra y condiciones de crecimiento.....	13
Determinación de Zn en los germinados por espectrometría acoplada al plasma de inducción de emisión atómica ICP-AES .....	14
Extracción y cuantificación de polifenoles en los germinados .....	14

<b>Cuantificación total de flavonoides.....</b>	14
<b>Capacidad antioxidante .....</b>	15
<b>Proteínas solubles .....</b>	16
<b>Azúcares totales .....</b>	16
<b>Azúcares reductores .....</b>	17
<b>Diseño experimental y análisis estadístico .....</b>	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	18
<b>Caracterización de nanopartículas de óxido de Zn.....</b>	18
<b>Interacción del tipo de fertilizante y la concentración para la elongación de plúmula y radícula .....</b>	22
<b>Contenido de Zn en plántulas de cebada .....</b>	24
<b>Interacción del tipo de fertilizante y la concentración para el nivel de Zn.....</b>	26
<b>Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en el contenido total de fenoles .....</b>	35
<b>Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en la capacidad antioxidante</b>	37
<b>Componentes químicos en las cariópsides después de la germinación .....</b>	39
<b>Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en el contenido de proteínas solubles, azúcares totales y azúcares reductores en las cariópsides después de la germinación .....</b>	41
<b>CONCLUSIONES.....</b>	44
<b>REFERENCIAS .....</b>	45

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Incremento de peso de las semillas por imbibición de agua en función del tiempo.....	12
<b>Cuadro 2.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para la germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	19
<b>Cuadro 3.</b> Comparación de medias por el tipo de fertilizante para germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	20
<b>Cuadro 4.</b> Comparación de medias por el nivel de concentración para germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	21
<b>Cuadro 5.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de Zn en plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	24
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de medias por el tipo de fertilizante para el contenido de Zn en las cariópsides de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	25
<b>Cuadro 7.</b> Comparación de medias por el nivel de concentración para el contenido de Zn en las cariópsides de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn. ....	25
<b>Cuadro 8.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de germinados (plúmula) sometidos a diferentes tratamientos y concentraciones con compuestos de Zn. ....	29
<b>Cuadro 9.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de germinados (raíz) sometidos a diferentes tratamientos y concentraciones con compuestos de Zn. ....	29
<b>Cuadro 10.</b> Comparación de medias para concentración de polifenoles y capacidad antioxidante por el tipo de fertilizante aplicado en plúmula y radícula. ....	31
<b>Cuadro 11.</b> Comparación de medias de la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante por el nivel de concentración para plúmula y radícula. ....	33
<b>Cuadro 12.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de compuestos químicos en las cariópsides que fueron sometidas a compuestos de Zn.....	39
<b>Cuadro 13.</b> Comparación de medias por el tipo de fertilizante para el contenido de compuestos químicos en las cariópsides que fueron sometidas a compuestos de Zn. ....	40
<b>Cuadro 14.</b> Comparación de medias por el nivel de concentración para el contenido total de proteínas solubles, azúcares totales y azúcares reductores en las cariópsides después de la germinación. ....	41

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de imbibición de agua en semillas de cebada ..... 12
- Figura 2.** Preparación y aplicación de tratamientos con las fuentes de Zn a concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup> durante la germinación de semillas de cebada ..... 13
- Figura 3.** Análisis EDX de GNPsZnO y NPsZnO ..... 18
- Figura 4.** Micrografías obtenidas mediante TEM de a) GNPsZnO y b) NPsZnO ..... 19
- Figura 5.** Porcentaje de germinación (A) y acumulación de peso seco (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mgL<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05) ..... 22
- Figura 6.** Longitud de plúmula (A) y raíz (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mgL<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05) ..... 23
- Figura 7.** Contenido de Zn en ppm en plántulas de cebada sometidas a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05) ..... 26
- Figura 8.** Concentración de fenoles en plúmula (A) y raíz (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las cuatro repeticiones (n=3). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05) ..... 35
- Figura 9.** Concentración de flavonoides en plúmula (A) y raíz (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05) ..... 36
- Figura 10.** Concentración de taninos en plúmula (A) y raíz (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05) ..... 37
- Figura 11.** Capacidad antioxidante por el método DPPH en plúmula (A) y raíz (B), capacidad antioxidante por el método ABTS en plúmula (C) y raíz (D), capacidad antioxidante por el método FRAP en plúmula (E) y raíz (F) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las

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,  $P \leq 0.05$ ). ..... 38

## **RESUMEN**

# **BIOFORTIFICACIÓN DE GERMINADOS DE CEBADA CON NANOMATERIALES DE ZnO**

Por

**ROCÍO MARLEN RAMÍREZ LÓPEZ  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DR. JOSUÉ ISRAEL GARCÍA LÓPEZ- ASESOR-**

Saltillo, Coahuila

Marzo, 2025

El objetivo de esta investigación fue determinar el impacto de la impregnación de semillas de cebada con diferentes compuestos de Zn como nanopartículas metálicas (NPsZnO), orgánicas de síntesis verde (GNPsZnO) y una sal (ZnSO<sub>4</sub>) a concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg L<sup>-1</sup>, sobre el nivel de biofortificación de los germinados, además, de las respuestas fisiológicas, bioquímicas y antioxidantes. En primera instancia: la caracterización de los nanomateriales indica que están compuestos principalmente por Zn y O, en las GNPsZnO el porcentaje de masa fue de Zn (79.93 %) y O (20.06 %), mientras que las NPsZnO tienen un porcentaje de Zn (82.8%) y O (17.18%). Enseguida se realizó la impregnación de semillas y posteriormente su siembra. Al terminar el ensayo de germinación los datos indicaron que el crecimiento con GNPsZnO a 25 mg L<sup>-1</sup>, fue el tratamiento más efectivo para estimular positivamente la germinación, mientras que el ZnSO<sub>4</sub> a 15 mg L<sup>-1</sup> presentó una disminución del 14% con respecto al testigo, el impacto negativo en la germinación al aplicar ZnSO<sub>4</sub> se reflejó en menor acumulación de peso seco con reducciones del 20 y 22% a 10 y 15 mg L<sup>-1</sup>.

La reducción en el crecimiento de las plántulas sometidas a ZnSO<sub>4</sub> se asocia a una mayor acumulación de Zn. En cuanto a los parámetros bioquímicos todos los materiales de Zn aplicados mejoraron la concentración de polifenoles en la plúmula y radícula, lo que resultó en incrementos de la capacidad antioxidante. En cuanto a los componentes primarios, para azúcares totales el ZnSO<sub>4</sub> a 20 mg L<sup>-1</sup> supera al testigo en 51.81%, en cambio las GNPsZnO a 15 mg L<sup>-1</sup> fueron inferior al testigo en 10%. En azúcares reductores se presentó un incremento en promedio del 37% entre las GNPsZnO a 10 y 15 mg L<sup>-1</sup>, no habiendo diferencias significativas entre ellas.

**Palabras clave:** *Hordeum vulgare*, nanofertilizantes, biofortificación, absorción del ion, germinados, metabolitos secundarios, compuestos primarios.

## **ABSTRACT**

BIOFORTIFICATION OF BARLEY SPROUTS WITH ZNO NANOMATERIALS

BY

ROCÍO MARLEN RAMÍREZ LÓPEZ  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DR. JOSUÉ ISRAEL GARCÍA LÓPEZ- ADVISOR-

Saltillo, Coahuila

March, 2025

The objective of this research was to determine the impact of the impregnation of barley seeds with different Zn compounds such as metallic nanoparticles (NPsZnO), organic green synthesis (GNPsZnO) and a salt ( $ZnSO_4$ ) at concentrations of 0, 5, 10, 15, 20 and 25 mg L<sup>-1</sup>, on the level of biofortification of the sprouts, as well as the physiological, biochemical and antioxidant responses. In the first instance: the characterization of the nanomaterials indicates that they are mainly composed of Zn and O, in GNPsZnO the mass percentage was Zn (79.93 %) and O (20.06 %), while NPsZnO have a percentage of Zn (82.8%) and O (17.18%). The seeds were then impregnated and subsequently sown. At the end of the germination trial, the data indicated that growth with GNPsZnO at 25 mg L<sup>-1</sup> was the most effective treatment to positively stimulate germination, while  $ZnSO_4$  at 15 mg L<sup>-1</sup> presented a decrease of 14% with respect to the control. The negative impact on germination when  $ZnSO_4$  was applied was reflected in lower dry weight accumulation with reductions of 20 and 22% at 10 and 15 mg L<sup>-1</sup>.

The reduction in the growth of seedlings subjected to  $ZnSO_4$  was associated with a greater accumulation of Zn. In terms of biochemical parameters, all Zn materials applied improved the concentration of polyphenols in the plumule and radicle, which resulted in increases in antioxidant capacity. As for the primary components, for total sugars,  $ZnSO_4$  at 20 mg L<sup>-1</sup> exceeded the control by 51.81%, while GNPsZnO at 15 mg L<sup>-1</sup> was 10% lower than the control. In reducing sugars, there was an average increase of 37% between the GNPsZnO at 10 and 15 mg L<sup>-1</sup>, with no significant differences between them.

**Keywords:** *Hordeum vulgare*, nanofertilizers, biofortification, ion uptake, sprouts, secondary metabolites, primary compounds.

## INTRODUCCIÓN

La malnutrición en humanos por falta de micronutrientes afecta a más de 3000 millones de personas en todo el mundo (González et al., 2020). El zinc (Zn), hierro (Fe) y yodo (I) son elementos deficientes particularmente en las mujeres y los niños de países en desarrollo, estas deficiencias se manifiestan en problemas como retraso en el crecimiento, falta de apetito, dermatitis, alopecia, deterioro de la función inmunológica lo que puede provocar diarrea frecuente y/o infección del tracto respiratorio superior, entre otras enfermedades (Álvarez Ariza et al., 2019). Por esto se puede convertir en un problema de salud social, pues lamentablemente, en los países donde basan su alimentación en el consumo de cereales básicos (arroz, frijol, maíz trigo y sorgo), la ingesta de micronutrientes como el Zn y el Fe se ve limitada, debido a la baja concentración de estos nutrientes en los granos (Arreola et al., 2015).

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 (Lucero et al., 2014). 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 (Almendros et al., 2014).

En atención a este problema, las investigaciones en agronomía han enfocado sus esfuerzos al incremento de la concentración de microelementos esenciales para la salud humana en tejidos comestibles de las plantas a través de la mejora genética, la fertilización y la biofortificación, la cual se define como el proceso que contribuye al aumento de nutrientes esenciales como el Zn y el Fe biodisponibles en las partes comestibles de las plantas (Sainz, 2019), siendo un proceso que favorece al aumento de contenido de nutrientes en una planta a través de la aplicación al suelo, semillas u hojas sin modificar la composición genética de la misma (Banuelos et al., 2008).

Algunos estudios han demostrado que existe un gran potencial en la explotación de variaciones genéticas que se han observado en semillas respecto a las concentraciones de micronutrientes como el hierro (Fe) y el zinc (Zn), sin ver afectado el rendimiento de la

cosecha; este es el caso de la biofortificación, en dónde se obtienen alimentos vegetales que son enriquecidos en micronutrientes biodisponibles; es decir, que los cultivos “se fortifican así mismos” y contienen altos niveles de vitaminas y minerales tanto en las raíces como en sus semillas, los que después son cosechados y consumidos por el hombre (Herrera, 2011). 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<sub>4</sub> 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 (Kumar 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 (Chaudhary et al., 2025). En este estudio, la biofortificación de germinados derivados de semillas expuestas a suspensiones con diferentes nanomateriales de Zn, representa una propuesta novedosa y viable para la obtención de un alimento con bioaccesibilidad de micronutrientes esenciales. Por lo anterior, el objetivo de este ensayo es determinar el impacto que tienen las nanopartículas tanto orgánicas como metálicas de Zn a diferentes concentraciones (5 a 25 mg L<sup>-1</sup>), sobre el nivel de biofortificación, las respuestas fisiológicas, bioquímicas y antioxidantes en germinados de grano de cebada.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVO

### **Hipótesis alterna**

$H_1$ : La aplicación de nanopartículas metálicas de óxido de zinc (NPsZnO), nanopartículas orgánicas de óxido de zinc (GNPsZnO) y el sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ ) a concentraciones de 5 a 25 mg L<sup>-1</sup> durante la germinación de semillas de cebada biofortificará el germinado, además modificará las respuestas fisiológicas, bioquímicas y antioxidantes.

### **Hipótesis nula**

$H_0$ : La aplicación de NPsZnO, GNPsZnO y  $ZnSO_4$  a concentraciones de 5 a 25 mg L<sup>-1</sup> durante en la germinación de semillas de cebada no biofortificará el germinado, ni modificará las respuestas fisiológicas, bioquímicas y antioxidantes.

### **Objetivo general**

Determinar el impacto de NPsZnO, GNPsZnO y  $ZnSO_4$  a concentraciones de 5 a 25 mg L<sup>-1</sup> sobre el nivel de biofortificación, respuestas fisiológicas, bioquímicas y antioxidantes del germinado de cebada.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Nanofertilizantes de ZnO en la impregnación de semillas

Dentro de los alcances de la nanotecnología, hoy en día se lleva a cabo la impregnación de las semillas, la cual es apta para brindar nutrientes como el zinc (Zn) y el hierro (Fe) durante las primeras etapas de la germinación, a fin de obtener plantas más vigorosas y que puedan hacer frente a problemas bióticos y abióticos (Hotegni et al., 2024).

La impregnación de las semillas desde la germinación, permite que se absorban iones de Zn que actúan en funciones importantes como componentes estructurales y en la intervención de la expresión génica, además también funcionan como catalizadores de metaloenzimas (amilasas y maltasas) que durante el proceso de germinación trabajarán de manera más eficiente para aprovechar y/o desdoblar el reservorio energético y que este pueda ser utilizado durante el desarrollo de la planta (King et al., 2016). Además, los iones de Zn son transferidos a la plántula nueva dónde se acumulan en tallo, raíz y hojas lo que resulta en funciones fisiológicas en respuestas al estrés como la síntesis de proteínas, carbohidratos y auxinas de una manera más eficiente (Kuvelja et al., 2024).

Por ejemplo, un estudio realizado en impregnación de semillas sobre el proceso germinativo *in vitro* en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*), demostró que las nanopartículas obtenidas mediante síntesis biogénica utilizando hojas de cilantro (*C. sativum*), lograron estimular la tasa de germinación e incrementar la velocidad y el desarrollo radicular, además no se encontraron muestras de fitotoxicidad (Asmat-Campos et al., 2023). Otro estudio realizado en semillas de lechuga romana (*L. sativa*), con la aplicación de nanopartículas de ZnO y ZnSO<sub>4</sub> durante el proceso de germinación, demostró no solo mejores resultados en el proceso germinativo, sino también de manera nutricional y nutraceútica en este cultivo (Benavides-Mendoza et al., 2023).

Recientemente se evaluó la germinación y las características morfológicas de las plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) en laboratorio, dónde las semillas fueron sometidas a diferentes nanomateriales sintetizados de ZnO durante un periodo de remojo (dos horas),

posteriormente se sembraron y una vez germinadas, se llevó a cabo la evaluación observando que la aplicación de estos materiales antes de la germinación, mejoran el desarrollo temprano de las plantas (Quirino García et al., 2024). Las mejoras en la germinación y crecimiento de las plántulas por la aplicación de nanomateriales de Zn se deben a la biofortificación, lo que resulta en mejoras agronómicas y fisiológicas. En el siguiente apartado se describe en qué consiste la biofortificación de plantas.

### **Biofortificación de plantas con el uso de nanomateriales de Zn**

La biofortificación, es una técnica innovadora que se ha desarrollado para aumentar el contenido de micronutrientes esenciales en las plantas de cultivos básicos que son ampliamente consumidos por las personas. Existen diferentes técnicas agrícolas para la biofortificación, entre ellas el mejoramiento genético y el manejo agronómico que utiliza fertilizantes y otros insumos para aumentar la absorción de nutrientes por los cultivos. El manejo agronómico ofrece una solución temporal pero rápida, mientras que el mejoramiento genético es la solución a largo plazo, sin embargo, es un proceso que requiere de mucho tiempo para desarrollar una variedad rica en nutrientes (Avnee et al., 2023).

En los últimos años, mediante el uso de estas técnicas se han logrado obtener alimentos vegetales enriquecidos con micronutrientes biodisponibles como el Fe y el Zn, sin ver afectado el rendimiento de la cosecha, además, contienen altos niveles de vitaminas y minerales tanto en las raíces como en las semillas, los que después son cosechados y consumidos por el hombre (Henao-González et al., 2024).

Sin embargo, los suelos agrícolas se ven mayormente afectados por la deficiencia de micronutrientes como el Zn; por esta razón la molécula de ZnSO<sub>4</sub> es la más utilizada para fertilización debido a su alta solubilidad y bajo costo (Gupta et al., 2016). En los sistemas biológicos se encuentran gran cantidad de proteínas de las cuales aproximadamente el 10% necesita del Zn para llevar a cabo sus funciones y estructura; además este interviene en algunos procesos 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 (Almendros et al., 2014). No obstante, a pesar de que el Zn es importante para las plantas, aproximadamente el 50% de los suelos agrícolas presenta carencias de este elemento, por otra parte, los fertilizantes de Zn utilizados son poco eficientes (Alloway, 2008).

En atención a esta problemática, la fertilización con nanomateriales representa una práctica agronómica viable para la fertilización de cultivos y de esta forma lograr la biofortificación (Magdaleno-García et al., 2023). A diferencia de los fertilizantes convencionales, los nanofertilizantes ofrecen una serie de beneficios, que incluyen solubilidad variable, alta consistencia, efectividad, actividad específica mejorada con concentración efectiva, además son capaces de retener una cantidad generosa de iones nutritivos que se liberan de manera análoga a los requerimientos del cultivo junto con ventajas como el aumento de nutrientes, así como la reducción de las pérdidas por volatilización o por lixiviación (Nitesh et al., 2023).

### **Impacto de los nanofertilizantes de ZnO en metabolitos secundarios de las plantas**

No obstante, la impregnación de las semillas con nanomateriales de ZnO ha reportado resultados positivos y negativos, esto debido a que las nanopartículas a nivel celular generan estrés oxidativo ya que se ve afectado el mecanismo de defensa antioxidante lo que resulta en daños o destrucción en la mitocondria y por ende daños en la división celular, crecimiento y desarrollo de las plantas (Tripathi et al., 2024).

Si bien, los nanomateriales se han utilizado para aumentar la concentración de nutrientes, también se ha documentado que generan estrés oxidativo, lo que se debe a que el mecanismo de absorción de los nanomateriales se lleva a cabo por endocitosis lo que permite que a nivel celular se lleve una gran acumulación de iones de Zn dentro de la célula (Stanton et al., 2022). Derivado de esto, se generan bioproductos naturales del metabolismo oxidativo celular llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO), de las cuales las más relevantes son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (San Miguel et al., 2009). Los cuales desempeñan funciones fisiológicas importantes como la inducción de genes de defensa y la movilización de los sistemas de transporte de iones, no obstante, la

producción anormal y excesiva de estos compuestos puede ser nociva para los organismos debido al desbalance entre la producción de éstos y la capacidad de las células para reducirlas, esto afecta negativamente el mantenimiento y regulación de funciones fisiológicas como la oxidación de proteínas, daños en el ADN, peroxidación lipídica entre otras (Viada Pupo et al., 2017). Es importante mencionar, que estos daños no dependen solo de la capacidad oxidativa de las ERO, sino es realmente al desbalance intracelular entre estos compuestos y la capacidad antioxidant de las plantas para producir metabolitos secundarios para contrarrestarlas (Geraldo León et al., 2022).

Las plantas eliminan las ERO a través de las acciones complejas y coordinadas de las enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y la peroxidasa; por ejemplo, la peroxidasa descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua ( $H_2O$ ) y O molecular, mientras que la superóxido dismutasa facilita la conversión de radicales superóxido en  $O^{-1}$  (Deepti et al., 2023).

Por otro lado, también se lleva a cabo la acumulación de metabolitos secundarios como los polifenoles, los cuales tienen la capacidad de inhibir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno al transferir electrones a los radicales libres, además de activar enzimas antioxidantes y mejorar el estrés oxidativo (de Araújo et al., 2021). En este caso, utilizar nanomateriales para biofortificar la planta es bueno, además de incrementar la concentración de ERO en un nivel dónde no sea dañino para la planta, pero que si permite una mayor acumulación de metabolitos secundarios (Tripathi et al., 2024). Por otra parte, compuestos del metabolismo primario también se ven modificados, en el siguiente apartado documentamos al respecto.

### **Biosíntesis de compuestos primarios en las plantas por la aplicación de nanofertilizantes de ZnO**

El Zn se considera uno de los micronutrientes más importantes para las plantas, aunque se requiera en pequeñas dosis (5-100 mg/kg), si no se dispone de la cantidad suficiente de este elemento, las plantas sufren estrés fisiológico desencadenando fallas en los sistemas enzimáticos y acciones metabólicas como la de carbohidratos y proteínas (Chen et al., 2021).

Un estudio realizado en frijol (*Phaseolus vulgaris*) sobre el efecto genotóxico de las NPsZnO sobre el ADN genómico y sobre la expresión de algunos genes que codifican proteínas, encontró los mejores valores de los criterios de la planta como el número de ramas y hojas por planta, el peso fresco y seco de ramas y hojas, así como el mayor rendimiento de semillas (Salama et al., 2019). Lo anterior, debido a que las NPsZnO modifican los procesos fisiológicos de las plantas, como el metabolismo de las proteínas, los hidratos de carbono y las auxinas, ya que estos intervienen en la división celular, proceso que se ve afectado por el aumento excesivo del nivel de Zn en la célula, alterando de esta manera los sistemas biofísicoquímicos de las plantas (Estrada et al., 2023).

Por otra parte, las altas concentraciones de Zn pueden ocasionar que no se lleve a cabo la correcta absorción y transporte de otros nutrientes como el cobre (Cu) y el Fe, esto debido a la competencia antagónica por el tamaño del radio iónico del compuesto. La literatura, ha documentado que a concentraciones de  $30 \text{ mg Kg}^{-1}$  se realiza una síntesis correcta de los carbohidratos en los brotes de las plantas, mientras que a  $6 \text{ mg Kg}^{-1}$  se presentan deficiencias, causando de esta manera la alteración de la actividad fotosintética, la conductancia estomática y muchas otras funciones metabólicas vitales. Estas tensiones pueden dar lugar a cambios irreversibles que limitan la división y el crecimiento celular, disminuyen la fertilidad, promueven la senescencia e incluso causan la muerte celular en casos extremos (Chen et al., 2021).

Por lo que es conveniente que los cultivos agrícolas tengan una buena fertilización de Zn, dentro de las tecnologías emergentes los nanofertilizantes permiten mejorar respuestas fisiológicas en germinados y plantas; de tal manera que los productos procedentes de estas plantas den lugar a alimentos con mayores contenidos nutricionales. En este caso, las nanopartículas modifican respuestas fisiológicas y agronómicas mejorando el proceso de germinación, respuestas de vigor, crecimiento vegetativo, acumulación de compuestos bioactivos y tolerancia a estrés (Kadri et al., 2024). En el siguiente apartado se documentan algunas alternativas de alimentos funcionales derivados de plantas biofortificadas.

### **Desarrollo de productos funcionales a partir de plantas sometidas a ZnO**

Derivado de las aplicaciones que se han dado al uso de nanomateriales en la producción de plantas y sus frutos, se ha identificado que estos aportan mayor contenido nutricional y nutraceutico. Es por esto, que debemos dar aprovechamiento al desarrollo de productos funcionales procedentes o que han sido sometidos a nanofertilizantes. Por ejemplo, podemos mencionar un estudio donde utilizaron extracto de *Nigella sativa* y acetato de Zn para sintetizar nanopartículas de Zn, que luego se utilizaron para biofortificar hongos (*Pleurotus pulmonarius*), esto con el fin de producir un alimento nutricionalmente equilibrado y que sea de un costo accesible para la población más vulnerable. El *Pleurotus pulmonarius* obtenido demostró tener una capacidad muy peculiar para bioacumular los metales que estaban en su entorno externo, aumentando la absorción de Zn por los cuerpos fructíferos de dicho hongo (Ali et al., 2024).

Otro producto elaborado mediante el uso de granos de trigo agronómicamente biofortificados con Zn y selenio (Se), fue un pan de masa madre, al cual se le hicieron evaluaciones físicas, fisicoquímicas y nutricionales. Las concentraciones de zinc y selenio de los panes cumplieron con las cantidades diarias recomendadas. Por otra parte, el contenido fenólico total y la actividad antioxidante aumentaron en los panes, donde también se evaluó la efectividad de algunas levaduras que se mezclaron con estas harinas ricas en Zn y Se, obtenidas por biofortificación agronómica de trigo, esto con el fin de eliminar la deficiencia de estos microelementos en panes de masa madre locales (Karaduman et al., 2024).

Un estudio realizado en aplicación foliar de complejos orgánicos de Zn mostró una mejora sustancial en el crecimiento, el rendimiento, la calidad de la fruta, el contenido de nutrientes y antioxidantes de manzana (*Malus × domestica Borkh*), en comparación con el sulfato de Zn. El aumento de los rasgos de crecimiento vegetativo de la manzana se atribuye al papel fundamental del Zn en la elongación celular, la funcionalidad de la membrana celular y la síntesis de proteínas (Saini et al., 2024).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Sitio experimental y material genético**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ensayo de Semillas, del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Granos y Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (Saltillo, Coahuila., México). La semilla utilizada fue variedad certificada Prunella (Semillas El Trébol, Santa María Huecatitla, México).

### **Fuentes y caracterización de materiales de Zn**

Las nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y el sulfato de Zn ( $ZnSO_4$ ) se adquirieron en Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, USA). Las hojas de *Moringa oleifera* que se utilizaron para síntesis verde de nanopartículas de óxido de zinc (GNPsZnO) se recolectaron en General Escobedo, Nuevo León, Méx, en las coordenadas ( $25^{\circ}49'30''N$   $100^{\circ}21'29''O$ ).

### **Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO**

Las hojas de *Moringa oleifera* fueron secadas a temperatura ambiente y se molieron en un molino planetario Pulverisette 6 (Idar-Oberstein, Renania-Palatinado, DE). Posteriormente, el polvo se pasó por un tamiz de 250  $\mu m$  usando tamices Tyler (WS Tyler, Guadalajara, Jalisco, Méx.), después se pesaron 6 g que se mezclaron con 600 mL de etanol absoluto (96 %), esta mezcla fue colocada en un matraz de tres bocas provisto con un refrigerante y reflujo durante 2 h a 70 °C. Finalmente, el extracto se filtró con malla de naylon de 400 micras de grado alimenticio (127 x 76.2 cm), seguida de un filtro Whatman (110 mm diámetro) y se guardó en refrigeración a 4 °C para su posterior uso.

### **Síntesis de GNPsZnO mediante química verde**

La síntesis de GNPsZnO se llevó a cabo en un matraz bola de tres bocas, dónde se colocaron 13.7 g de acetato de Zn ( $Zn(AcO)_2$ ) y 600 mL del extracto obtenido en la etapa anterior. Esta solución fue agitada constantemente a una temperatura de 75 °C en reflujo durante 2 h. Después, se agregó una solución acuosa 0.2 M de NaOH en forma de goteo para ajustar el pH de reacción a 8. Se continuó con agitación constante durante 24 h. Posteriormente, la solución obtenida fue centrifugada a 17608 g durante 5 min para separar la materia insoluble. El precipitado fue lavado dos veces con etanol absoluto (96 %) y luego secado en una estufa

de secado RIOSA H-33 (RSU, Monterrey, Méx.) a 60 °C por 24 h. Enseguida, el precipitado obtenido fue calcinado en una mufla a 600 °C y finalmente triturado en un mortero para obtener un polvo fino (Neira-Vielma et al., 2022).

### **Caracterización de los nanomateriales de ZnO**

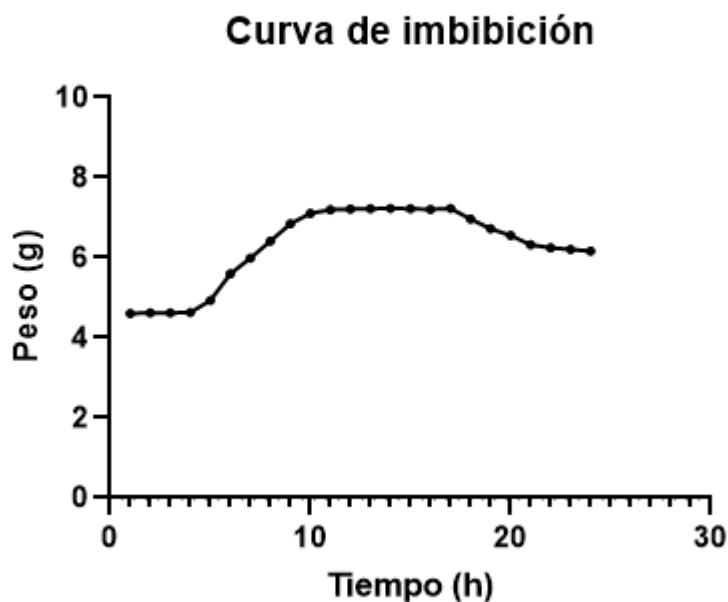
La morfología y microestructura de las muestras fueron examinadas por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM y HRTEM), y difracción electrónica de área (SAED) utilizando un microscopio FEI-TITAN 80–300 kV (Fisher Scientific, Hillsboro, Oregón, USA), operado a una tensión de aceleración de 300 kV. Las micrografías se procesaron utilizando un software de transformación rápida de Fourier (Digital Micrograph 3.7.0, Gatan Software, Pleasanton, California, USA) (Neira-Vielma et al., 2022).

### **Curva de imbibición y tiempo de exposición a las soluciones/suspensiones con Nanopartículas (NPs)**

Las semillas seleccionadas para el estudio se colocaron en cajas de Petri (cuatro repeticiones de 100 semillas), y se añadieron 10 mL de agua destilada a cada repetición, enseguida se colocaron en una cámara Equitec EGCS 3S, con ambiente controlado (Equitek Guadalajara, Méx.) a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Antes de añadir el agua se registró el peso inicial de las semillas, posteriormente se pesaron cada hora durante 24 h en una balanza analítica AND HR-200 (ELC, Itagüí, Antioquia, Col). La imbibición de la semilla se expresó como incremento del peso por absorción de agua con respecto al peso inicial, y con relación a la curva de imbibición se determinó que este proceso dura 17 h (Figura 1), tiempo seleccionado para someter las semillas a imbibición con los tratamientos de NPs. A continuación, se presentan los valores registrados (Cuadro 1) y la curva obtenida.

**Cuadro 1.** Incremento de peso de las semillas por imbibición de agua en función del tiempo.

Tiempo (h)	Peso (g)
1	4.605
2	4.619
3	4.623
4	4.629
5	4.932
6	5.605
7	5.984
8	6.416
9	6.843
10	7.104
11	7.198
12	7.211
13	7.224
14	7.225
15	7.221
16	7.208
17	7.226
18	6.965
19	6.724
20	6.554
21	6.321
22	6.245
23	6.201
24	6.165



**Figura 1.** Curva de imbibición de agua en semillas de cebada.

### Preparación y aplicación de tratamientos

Las soluciones/suspensiones a base de Zn se prepararon en una solución madre de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  en agua desionizada y homogeneizada con un sonificador Bransonic M1800H (Emerson, Branson Ultrasonics Bath, Brookfield, USA) durante 30 min a 110 voltios-3 amperios y 50 Ghz. Posteriormente, las suspensiones se diluyeron para preparar concentraciones a 5, 10, 15, 20 y  $25 \text{ mg L}^{-1}$  para cada fuente de Zn, además de un testigo con agua destilada, las cuales fueron utilizadas como tratamientos aplicados durante la imbibición de semillas (periodo de 17 h, Figura 1) que fueron colocadas en cajas de Petri con ocho repeticiones de 50 g de semillas y 50 mL por tratamiento, enseguida se colocaron en la cámara de crecimiento con

las especificaciones anteriores para el fotoperiodo. Durante el proceso de la germinación, la fase I es la imbibición y esta involucra una rápida absorción de agua debido al potencial hídrico de las semillas a los espacios apoplásticos, por esta razón se aplicaron los tratamientos en esta fase, a fin de que influyan en el metabolismo de la semilla en las fases II y III en las cuales se sintetizan proteínas y comienza la división celular.



**Figura 2.** Preparación y aplicación de tratamientos con las fuentes de Zn a concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup> durante la germinación de semillas de cebada.

### Siembra y condiciones de crecimiento

Después de la imbibición de las semillas con los tratamientos de Zn, las semillas se colocaron sobre una hoja de papel Anchor previamente humedecida con agua destilada acomodándolas en hiladas, dejando espacio suficiente entre ellas y respetando 6 cm del borde superior y de 2 a 3 cm en los costados. Luego se cubrieron con otra hoja de papel humedecida y se enrollaron en forma de “taco”, después se colocaron los “tacos” en una bolsa de polietileno y se instalaron sobre una bandeja de plástico profunda que se llevó a la cámara de crecimiento Equitec EGCS 3S, con ambiente controlado (Equitek Guadalajara, Méx.) a 25 °C y 75 % de humedad relativa por siete días (Barone et al., 2016). Una vez obtenidos los germinados, se determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de germinación, longitud de plúmula y radícula (cm), acumulación de biomasa seca en miligramos por plántula (mg plántula L<sup>-1</sup>). Posteriormente, se procedió a separar cada parte de las estructuras cortando con un bisturí plúmula, radícula y cariópside, 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 Cgoldenwall 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 y la determinación de Zn.

### **Determinación de Zn en los germinados por espectrometría acoplada al plasma de inducción de emisión atómica ICP-AES**

Después del secado y tamizado de las muestras se tomaron 0.2 g y se secaron a 60 °C en un horno Yamato Scientific DX 602C (Santa Clara, California, EUA) durante 72 h. El resultante fue triturado y sometido a digestión ácida en una mezcla de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) y ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). Las concentraciones de Zn en los tejidos se llevaron a cabo con el uso del extracto de digestión ácida utilizando un espectrómetro acoplado al plasma de inducción de emisión atómica ICP-AES Agilent 725-ES (Santa Clara, California, EUA). Para el control de las lecturas, se empleó una solución estándar multi elemental de 1 mg/L (Ruiz-Torres et al., 2021).

### **Extracción y cuantificación de polifenoles en los germinados**

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 3.13 g (Lopez- Contreras et al., 2015). Enseguida, las muestras se centrifugaron a 1585 g, 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 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 ( $\text{mg GAE kg}^{-1}$ ), calculado a partir de la curva de calibración del ácido gálico de 0 a 200  $\text{mg L}^{-1}$  (Muñiz-Márquez et al., 2013).

### **Cuantificación total de flavonoides**

La determinación del contenido de flavonoides se basó en la reacción del complejo  $\text{AlCl}_3-\text{NaNO}_2-\text{NaOH}$ , para esto se tomaron 0.2 mL del extracto y se agregaron 3.5 mL de agua

destilada. Posteriormente, se agregaron 0.15 mL de NaNO<sub>2</sub> al 5 %, 0.15 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10 % y 1 mL de NaOH 1 M, a intervalos de 5 min cada uno. La reacción se dejó durante 15 min y después se midió la absorbancia a 510 nm. El contenido total de flavonoides se informó en miligramos equivalentes de (+)-catequina por cien gramos de muestra (mg CE/100 g), calculado a partir de la curva de calibración de (+)-catequina de 0 mg L<sup>-1</sup> a 200 mg L<sup>-1</sup> (Zhishen et al., 1999).

### **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 µM en metanol al 80 %, con una absorbancia ajustada a 0.7 a 517 nm. El ensayo se llevó a cabo mezclando 50 µL 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.

La capacidad antioxidante de ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico)] se llevó a cabo utilizando una solución de trabajo obtenida mezclando 1 mL de ABTS al 7.4 mM y 1 mL de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) al 2.6 mM, permitiéndoles reaccionar durante 12 h en oscuridad. Después, la absorbancia de la solución de trabajo se ajustó a 0.7 a 734 nm diluyendo con metanol. El ensayo ABTS se realizó mezclando 50 µL del extracto fenólico con 1.5 mL de solución de trabajo ABTS. La reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad y se medió la absorbancia.

La capacidad antioxidante de FRAP (poder antioxidante reductor férrico) se determinó utilizando una solución de trabajo preparando una mezcla de 300 mM·C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triacin, en HCl 40 mM) y 20 mM de FeCl<sub>3</sub>·6HO en proporción 10:1:1 (V:V:V). El ensayo FRAP se preparó mezclando 50 µL del extracto con 1.5 mL de solución de trabajo FRAP, la reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad a 37 °C y la absorbancia de las muestras se tomó a 593 nm. La capacidad antioxidante para DPPH, ABTS y FRAP se reportó en micromoles de trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) equivalente por cien gramos de muestra (µmol TE/100 g), con base a la curva de calibración con trolox en concentraciones de 0 a 500 µmol/L.

## Análisis nutricionales en cariópsides

Las cariópsides fueron secadas en una estufa a 60 °C durante 72 h, hasta alcanzar el peso constante. El material se molió en un molino planetario (Pulverisette 6 Idar-Oberstein, Renania-Palatinado, DE) con un tamiz de 1 mm de diámetro. Las muestras se envasaron en frascos de cristal con cierre hermético, debidamente identificados y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

### Proteínas solubles

Se llevó a cabo mediante la técnica Bradford, se preparó el reactivo disolviendo 100 mg del colorante Azul de Comassie G-250 que se adquirió en Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, USA), en 50 mL de etanol al 95%. Se agregaron 100 mL de ácido fosfórico al 85% y posteriormente se aforó con agua destilada a 1 L. De manera paralela se preparó una curva patrón utilizando Albumina Sérica Bobina (Sigma-Aldrich. San Luis, Misuri, USA). Luego se colocaron 100 µL de muestra del extracto de la cariópside, se le agregaron 5 mL del reactivo de Bradford, se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h. Se preparó simultáneamente un tubo con el blanco agregando 100 µL de agua destilada con 5 mL del reactivo de Bradford. Posteriormente se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 595 nm y el resultado se expresó en mg/L.

### Azúcares totales

Se llevó a cabo mediante la técnica Fenol-Sulfúrico, se tomaron 0.5 g de cada una de las muestras obtenidas en el proceso anterior, luego se añadieron 1.5 mL de agua destilada y se sometieron a baño maría a 60 °C y se mantuvieron así durante dos h, posteriormente se centrifugaron a 489 g durante tres min para poder recuperar el sobrenadante. Enseguida, se preparó una solución madre con 10 mg de dextrosa anhidro d-glucosa en 100 mL de agua destilada, se realizó la curva de calibración de glucosa de 0 a 1000 mgL<sup>-1</sup> y luego se tomaron 50 µL de cada uno de los extractos de los germinados y se agregaron 950 µL de agua destilada, luego se agregaron 2 mL de fenol al 5 % y posteriormente 5 mL de ácido sulfúrico, seguido de esto, se colocaron las muestras a ebullición durante 5 min a baño maría, se dejó

enfriar por unos minutos y se leyó en un espectrofotómetro a 490 nm, el resultado se reportó en mg/L. (DuBois et al., 1956)

### Azúcares reductores

Se llevó a cabo mediante la técnica del DNS, la solución madre se preparó del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y se realizó la curva de calibración de glucosa de 0 a 1000 mg L<sup>-1</sup> y luego se tomaron 5 µL del extracto y se añadieron 495 µL de agua destilada, posteriormente se agregaron 500 µL de la solución DNS, se llevó a ebullición a baño maría durante tres min, luego se agregaron 5 mL de agua destilada y se pasó a leer en un espectrofotómetro a 540 nm, el resultado se reportó en mg/L.

### Diseño experimental y análisis estadístico

El estudio se estableció bajo un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 3x5, considerando al factor “F” como las fuentes de Zn (NPsZnO, GNPsZnO y ZnSO<sub>4</sub>), y el factor “C” las diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg L<sup>-1</sup>). La diferencia estadística entre muestras se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) utilizando el paquete estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los resultados se informaron como valores medios de cuatro muestras ± desviación estándar.

### Modelo estadístico

$$y_{ijk} = \mu + F_j + C_k + (FC)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

$y_{ijk}$  = observación de la fuente de Zn “j”, en la concentración “k” y la “i” media general.

$\mu$  = media general de la variable observada.

$F_j$  = efecto de la fuente “j” (NPs ZnO, GNPs ZnO y ZnSO<sub>4</sub>)

$C_k$  = efecto de la concentración (0, 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>)

$(FC)_{jk}$  = efecto de la interacción fuente “j” con concentración “k”

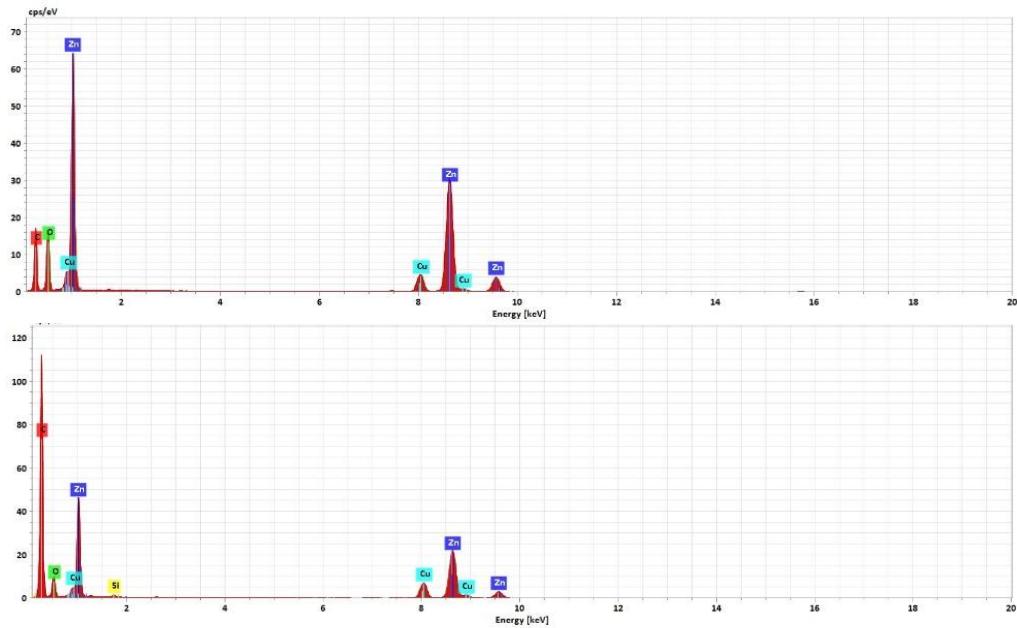
$\varepsilon_{ijk}$  = error experimental

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

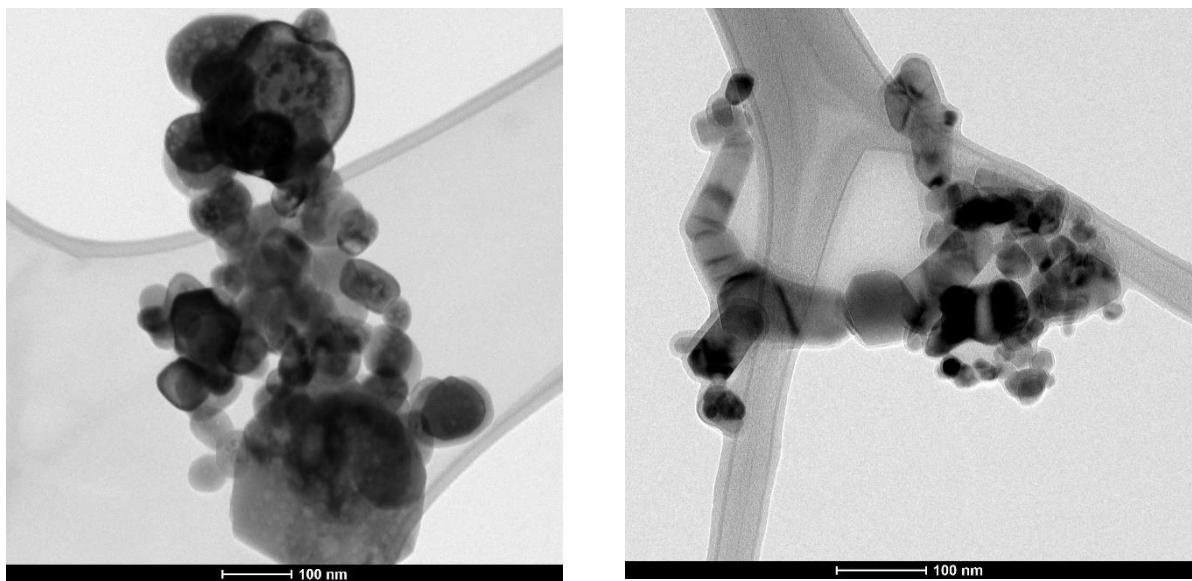
### Caracterización de nanopartículas de óxido de Zn

La pureza de las nanopartículas fue determinada mediante Energy Dispersive X-ray (EDX). Los espectros de ambas nanopartículas muestran picos intensos del pertenecientes al Zn y O, los cuales se observan en la Figura 3. El porcentaje de masa en GNPsZnO fue de Zn (79.93 %) y O (20.06 %). Las NPsZnO tienen un porcentaje de Zn y O 82.8 % y 17.18 % respectivamente. De acuerdo con el peso molecular de cada elemento, el porcentaje teórico esperado para Zn y O es de 80.3 % y 19.7 %. Estos resultados confirman que ambas NPsZnO poseen alta pureza.

La morfología y tamaño de las nanopartículas fue determinada mediante TEM (Figura 4). En la micrografía de la izquierda se observan las GNPsZnO las cuales poseen una morfología esférica con un tamaño promedio de 70 nm (Figura 4). Mientras que en micrografía de la derecha se observan las NPsZnO las cuales tienen una morfología heterogénea, en la cual se destacan partículas esféricas y bastones con un tamaño promedio de partícula de 41 nm.



**Figura 3.** Análisis EDX de GNPsZnO y NPsZnO.



**Figura 4.** Micrografías obtenidas mediante TEM de a) GNPsZnO y b) NPsZnO.

#### Germinación y crecimiento de plántulas por tipo de fertilizante de Zn

En el Cuadro 2, se puede observar que las fuentes de variación nanopartículas, concentración y la interacción entre ellas, afectaron significativamente ( $p \leq 0.01$ ) la germinación y el crecimiento de las plántulas. El efecto observado se debe a que el Zn puede intervenir en las primeras etapas de la germinación al ser considerado como una metaloproteína, que activa enzimas como  $\alpha$  y  $\beta$  amilasa que intervienen en la degradación del contenido de reserva de la semilla. En el siguiente apartado (comparación de medias), discutimos a detalle los impactos generados por fuente de variación y la interacción.

**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	Germinación (%)	Peso Seco (mg/plántula)	GL	LP (cm)	LR (cm)
Nanopartículas	3	412.04*	0.00001652*	3	142.79**	13.05*
Concentración	4	177.24*	0.00000192*	4	32.48	13.36
Nps*Conc	8	184.71*	0.00000359*	8	34.58**	6.47*
Error	38	111.53	0.00000551	694	11.11	4.36
C.V.		20.08	18.37		26.33	18.02

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

Para la comparación de medias (Cuadro 3), los resultados muestran que, en la germinación y acumulación de peso seco, las GNPsZnO y NPsZnO presentaron los resultados más favorables con incrementos promedio del 13 y 7% en comparación con el testigo, respectivamente. Mientras que, el ZnSO<sub>4</sub> resulta menos eficiente para estos parámetros, siendo 0.9 y 12.3% inferior al testigo. Por otra parte, para LP y LR los mismos tratamientos (GNPsZnO y NPsZnO) presentaron en promedio los mejores resultados con incrementos del 11.5 y 5%, respectivamente, no obstante, con ZnSO<sub>4</sub> no se observaron diferencias significativas en comparación con el testigo.

**Cuadro 3.** Comparación de medias por el tipo de fertilizante para germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn.

Tipo de fertilizante	Germinación (%)	Peso Seco (mg/plántula)	LP (cm)	LR (cm)
Testigo	48.44 b	0.01291 b	11.75 b	11.26 b
ZnSO <sub>4</sub>	48.00 b	0.01132 b	11.74 b	11.64 ab
NPsZnO	52.53 ab	0.01344 ab	13.53 a	11.73 ab
GNPsZnO	59.73 a	0.01387 a	13.07 a	11.89 a

LP= Longitud de plúmula; LR= longitud de radícula. Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

En un ensayo de germinación dónde evaluaron la impregnación de semillas sobre el proceso germinativo *in vitro* en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*), se demostró que las nanopartículas orgánicas lograron estimular la tasa de germinación habiendo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones utilizadas (C=10.14, C2=0.053 y C3=0.035 unidades de absorbancia), sin embargo, la muestra control superó a los tratamientos con ZnO en este parámetro con 4.16%. También se evaluaron la velocidad y el desarrollo radicular, logrando el tratamiento C1 una longitud radicular final mayor (50.05 mm), respecto a la muestra control (44.95 mm), sin encontrar muestras de fitotoxicidad (Asmat-Campos et al., 2023).

Las semillas que son impregnadas con nanofertilizantes de ZnO, presentan alteraciones en los procesos fisiológicos, esto debido a que, las semillas tienen la capacidad de sintetizar de manera eficiente los nuevos materiales nutritivos que son absorbidos al interior de las semillas facilitando la transferencia del nuevo producto al embrión, permitiendo de esta manera que la acumulación de iones de Zn estimule la síntesis de triptófano, que a su vez,

estimula la génesis de auxinas, citoquininas y giberelinas, todas ellas hormonas implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Asmat-Campos et al., 2023).

### Efecto de la concentración de Zn sobre la germinación y el vigor

En el Cuadro 4, se muestran los resultados obtenidos según la concentración de los nanomateriales, los cuales indican que para el parámetro de germinación resulta más eficiente la aplicación de nanofertilizantes a concentración de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , superando al testigo en 18%, siendo la concentración a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  donde se observó una disminución del 2.7% en comparación con el testigo. Mientras que para la acumulación del peso seco los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones  $15$  y  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , siendo superiores al testigo en 4 y 8%, respectivamente. En cambio, a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  se observó una disminución de 4.5% respecto al testigo. Para la evaluación de LP y LR, el tratamiento de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  presentó los más altos valores con incrementos del 9 y 4% superior al testigo, respectivamente. La concentración a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  en ambas estructuras, presentó los más bajos promedios siendo solo 4.2% superior al testigo en la plúmula y 3.3% inferior al testigo en la raíz.

**Cuadro 4.** Comparación de medias por el nivel de concentración para germinación y el crecimiento de plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn.

CONCENTRACIÓN ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Germinación (%)	Peso seco ( $\text{mg/plántula}$ )	LP (cm)	LR (cm)
Testigo	48.44 c	0.012753 ab	11.75 b	11.57 ab
5	53.33 ab	0.012303 ab	12.86 ab	11.75 ab
10	55.55 ab	0.012291 ab	12.27 b	11.18 b
15	52.00 ab	0.013286 a	12.53 ab	11.22 b
20	47.11 c	0.012174 b	13.60 a	11.98 a
25	59.11 a	0.013871 a	12.93 ab	11.89 a

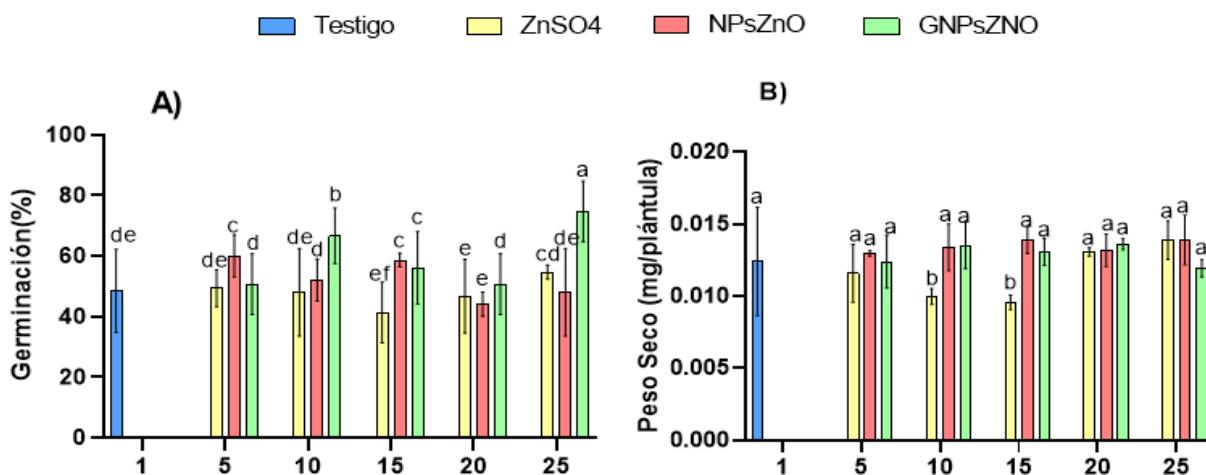
LP= Longitud de plúmula; LR= longitud de radícula. Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Un ensayo realizado en síntesis de nanomateriales de ZnO por diferentes métodos y su efecto en la germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus*), indica diferencias significativas en el índice de vigor y germinación en el tratamiento con ZnSO<sub>4</sub>, el cual superó en 12% los valores obtenidos para el tratamiento con nanoestructuras de ZnO. Para longitud de la raíz, la aplicación de ZnSO<sub>4</sub> también superó en 11% al tratamiento con nanoestructuras de ZnO,

por lo que la respuesta positiva o negativa dependerá del tamaño de las nanopartículas, método de síntesis, concentración utilizada y de la especie (Quirino-García et al., 2024).

### Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en la germinación y acumulación de peso seco

En la Figura 5, se presenta la interacción de los tratamientos con las diferentes concentraciones aplicadas a las semillas de cebada, se puede observar que, para la germinación (Figura 5A), los mejores valores se obtuvieron con el tratamiento GNPsZnO a una concentración de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , superando por 35% al testigo, y siendo el ZnSO<sub>4</sub> el tratamiento con los más bajos resultados, observando una disminución del 14% con respecto al testigo. Para la acumulación de peso seco (Figura 5B), en general, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Sin embargo, el ZnSO<sub>4</sub> a concentraciones de 10 y 15 mg L<sup>-1</sup> tuvieron un impacto negativo siendo 20 y 22% inferiores al testigo, respectivamente.

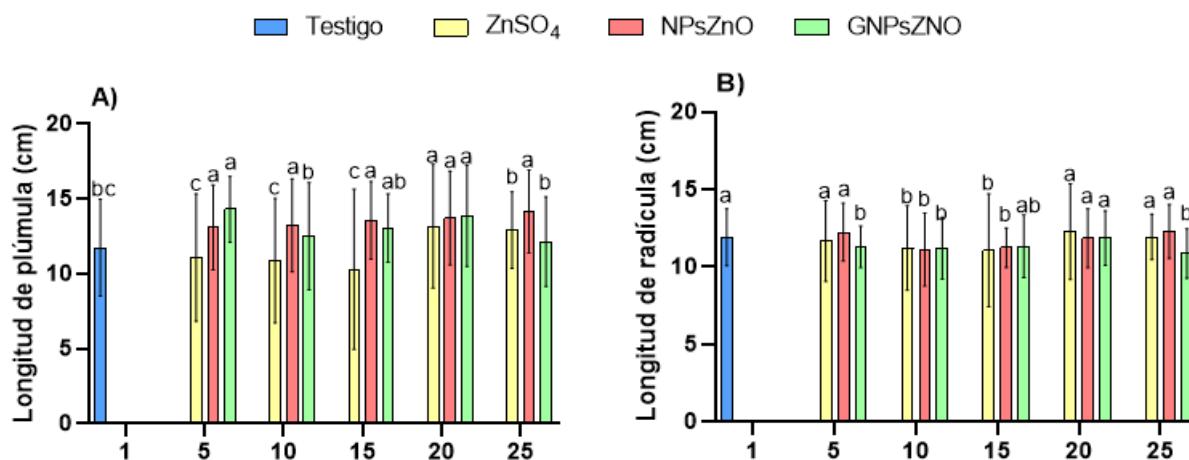


**Figura 5.** Porcentaje de germinación (A) y acumulación de peso seco (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mgL<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las cuatro repeticiones ( $n=4$ ). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

### Interacción del tipo de fertilizante y la concentración para la elongación de plúmula y raíz

Los resultados indican que para LP (Figura 6A), todos los tratamientos a concentración de 20 mg L<sup>-1</sup> lograron el mayor crecimiento de plúmula, superando en promedio en 13% al

testigo, siendo el  $\text{ZnSO}_4$  a concentraciones de 5, 10 y 15  $\text{mg L}^{-1}$  dónde se observó una disminución en promedio del 8.3% respecto al testigo. De igual manera, para LR (Figura 6B) la concentración de 20  $\text{mg L}^{-1}$  para todos los compuestos de Zn, es dónde se observaron los mejores resultados, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en comparación con el testigo. Por otra parte, se observó que en todos los tratamientos a concentración de 10  $\text{mg L}^{-1}$  se obtuvo una disminución en promedio del 6% en comparación con el testigo.



**Figura 6.** Longitud de plúmula (A) y radícula (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25  $\text{mgL}^{-1}$ . Los valores son el promedio de las 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,  $P \leq 0.05$ ).

Un estudio realizado en *Capsicum annuum* L., dónde aplicaron nanopartículas de óxido de Zn a concentraciones de 100, 200 y 500 ppm durante la germinación, reveló que no hubo diferencias significativas entre tratamientos para el porcentaje de germinación, pero en el vigor de germinación hubo un incremento de 129.40% a 200 ppm, mientras que a 500 ppm hubo una disminución del 15.4% en comparación con el mejor resultado. De igual manera, para los parámetros de crecimiento de las plántulas observaron que para longitud de plúmula no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, pero para la longitud de la radícula se observó una disminución significativa a medida que se aumentó la concentración, lo que promovió la acumulación de compuestos fenólicos por un efecto fitotóxico (García López et al., 2018).

Los nanomateriales a diferencia de los fertilizantes comunes presentan una serie de beneficios, entre ellos la capacidad de retener una cantidad generosa de iones nutritivos que se liberan de manera análoga a los requerimientos del cultivo junto con ventajas como el aumento de nutrientes (Kumar et al., 2023). Por otra parte, los nanomateriales a base de metales pesados, incluidos los compuestos basados en Zn a una dosis adecuada, tienen impactos positivos en la germinación de semillas al actuar como estimulador del crecimiento de las plántulas debido a su forma y tamaño, en comparación con otras sales que se utilizan como fertilizantes (Xu et al., 2022). En este caso, según la literatura y los resultados del estudio, se sugiere que la respuesta germinativa de semillas y la morfología de plántulas por exposición a NPsZnO depende del tiempo de exposición, tipo de fertilizante y la concentración (Benavides-Mendoza et al., 2023).

### **Contenido de Zn en plántulas de cebada**

En el Cuadro 5, se observa como las fuentes de variación nanopartículas, concentración, así como la interacción entre ellas, afectaron significativamente el contenido de Zn en las plántulas de cebada que fueron sometidas a diferentes compuestos de Zn. Las diferencias observadas se deben a que el Zn independientemente de la fuente utilizada logró absorberse a través de las membranas de las semillas y acumularse a nivel celular. A continuación, presentaremos el efecto de las fuentes principales de variación para identificar qué tipo de fertilizante y concentración fueron más efectivos para la acumulación de este microelemento.

**Cuadro 5.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de Zn en plántulas de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn.

FV	GL	Contenido de Zn (ppm)
Nanopartículas	3	539.591**
Concentración	4	735.163**
Nps*Conc	8	295.325**
Error	32	5.349
C.V.		9.49

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

Para la comparación de medias por el tipo de fertilizante (Cuadro 6), los resultados muestran que el ZnSO<sub>4</sub> fue el fertilizante donde se obtuvo la mayor concentración de Zn, siendo superior al testigo 66% y superando en promedio 31% a las NPsZnO y GNPsZnO.

**Cuadro 6.** Comparación de medias por el tipo de fertilizante para el contenido de Zn en las cariópsides de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn.

Tipo de fertilizante	Contenido de Zn (ppm)
Testigo	10.837 c
ZnSO <sub>4</sub>	32.037 a
NPsZnO	21.685 b
GNPsZnO	22.068 b

Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

En la comparación de medias por el nivel de concentración (Cuadro 7), los resultados indican que el mayor contenido de Zn se obtiene al aplicar una concentración de 25 mg L<sup>-1</sup>, siendo esta superior al testigo en 72%. Mientras que, al aplicar una concentración de 5 mg L<sup>-1</sup> solo se logra aumentar el contenido de Zn en un 33%.

**Cuadro 7.** Comparación de medias por el nivel de concentración para el contenido de Zn en las cariópsides de semillas de cebada sometidas a compuestos de Zn.

CONCENTRACIÓN	Contenido de Zn (ppm)
1	10.837 c
5	16.355 c
10	18.199 c
15	24.767 b
20	27.948 b
25	39.048 a

Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

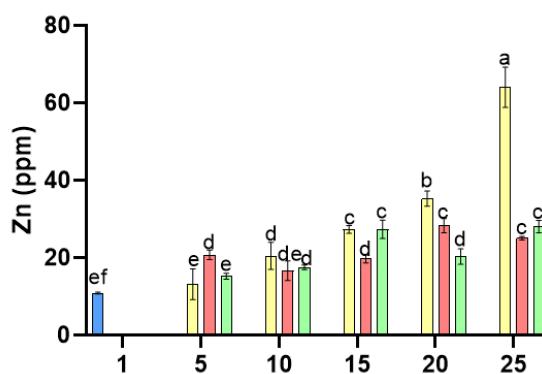
En cuanto al impacto fisiológico y bioquímico que se puede generar en las plantas, la diferencia entre las NPsZnO y el ZnSO<sub>4</sub> se atribuye a una liberación gradual del Zn<sup>++</sup> contenido en la fórmula. La disolución de las NPsZnO en agua desionizada (DI) es relativamente lenta y gradual, con solo el 2% de Zn disuelto comenzando después de 24 h (Reed et al., 2012). Por el contrario, el ZnSO<sub>4</sub> es altamente soluble por lo que durante la impregnación e imbibición de semillas puede ser eficiente para incrementar la concentración de este microelemento. En un estudio realizado en semillas de *Zea mays L.* donde se aplicó ZnSO<sub>4</sub> como tratamiento a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1 y 2%) durante un periodo

de remojo, indica que se logró aumentar 77 veces el contenido de Zn en comparación con semillas sin tratar, además de aumentar el porcentaje de germinación hasta un 90% (Choukri et al., 2022). Los incrementos en el porcentaje de germinación se deben a que el Zn es considerado como una metaloproteína, que durante la germinación puede activar diferentes enzimas metabólicas con fines catalíticos, división celular, síntesis de proteínas y mantenimiento de la estructura y función de la membrana plasmática, lo que resulta en mayor vigor (Hanif et al., 2024). A continuación, se presenta la interacción entre el tipo de fertilizante y las concentraciones aplicadas para la evaluación del contenido de Zn.

### Interacción del tipo de fertilizante y la concentración para el nivel de Zn

En la Figura 7, se presentan los resultados obtenidos para la interacción de los tipos de fertilizantes de Zn y las concentraciones, podemos observar que a concentraciones en el rango de 5 a 15 mg L<sup>-1</sup> el ZnSO<sub>4</sub> es estadísticamente igual que las otras fuentes de fertilizante, sin embargo, a partir de la concentración de 20 mg L<sup>-1</sup> el ZnSO<sub>4</sub> presenta incrementos considerables en cuanto al contenido de Zn en la plántula, se observa que a 25 mg L<sup>-1</sup> se logra superar al testigo en 83%, mientras que las NPsZnO a 20 mg L<sup>-1</sup> logran superar en 61% al testigo, y las GNPsZnO a 15 y 25 mg L<sup>-1</sup> superan en promedio al testigo en 61%.

■ Testigo ■ ZnSO<sub>4</sub> ■ NPsZnO ■ GNPsZnO



**Figura 7.** Contenido de Zn en ppm en plántulas de cebada sometidas a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05).

Un estudio realizado en guisantes (*Pisum sativum L.*) y girasol (*Helianthus annuus L.*) con tres fuentes de Zn (ZnSO<sub>4</sub>, Zn-EDTA, nanopolvo de ZnO) con soluciones/suspensiones a 25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> aplicadas por un periodo de 12 h, reportó que las semillas de guisante tratadas con ZnSO<sub>4</sub> a 200 y 100 ppm y el ZnO aplicado a 200 ppm aumentaron el contenido de Zn en la plántula de guisante en un 126%, 86.7% y 84.7%, respectivamente, en comparación al testigo. Por otra parte, la mayor acumulación de Zn en los brotes de girasol se logró aplicando ZnSO<sub>4</sub> a 200 ppm, seguido de ZnSO<sub>4</sub> a 100 ppm y ZnO a 200 ppm, resultando en contenidos de Zn que fueron 3.32, 2.58 y 2.2 veces mayores en comparación con el control, respectivamente (Poudel et al., 2023).

La alta translocación de Zn en la plántula con la aplicación de ZnSO<sub>4</sub> (ion Zn<sup>++</sup>), en comparación con las fuentes en forma de nanopartículas (NPsZnO y GNPsZnO) se debe a la alta solubilidad del ZnSO<sub>4</sub> (aproximadamente 305.42 mg L<sup>-1</sup>), que es mucho mayor que la solubilidad de las nanopartículas a base de Zn (89.81 mg L<sup>-1</sup>), que presentan una disponibilidad lenta y gradual de Zn disuelto (Reed et al., 2012). En conjunto, estos resultados indican una mayor absorción de Zn cuando se utiliza el sulfato de zinc monohidratado (ZnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O), ya que es altamente soluble en agua, por esta razón, los nanofertilizantes pueden ser más efectivos que los fertilizantes convencionales cuando el sistema de exposición es prolongado.

Dentro de las desventajas del uso de nanopartículas para la impregnación de semillas se encuentra la posibilidad de una disminución en la acumulación de iones de Zn durante la germinación de semillas, esto debido al corto tiempo que involucran las fases de la germinación y la disponibilidad de los iones de Zn que son liberados gradualmente durante un tiempo prolongado por los nanocomuestos (Choukri et al., 2022). Sin embargo, el Zn es un microelemento esencial en las plantas, pero este se demanda en pequeñas cantidades (5-100 mg/kg de tejido seco) (Chen et al., 2021), por lo que la acumulación excesiva de estos iones puede causar estrés oxidativo en el organismo, lo que resulta en una mayor acumulación de metabolitos secundarios, en el siguiente apartado se presentan los resultados de las evaluaciones realizadas para estos parámetros bioquímicos.

### **Concentración de polifenoles y capacidad antioxidante en plúmula y radícula**

Los resultados indican (Cuadro 8) que en plúmula hay una influencia significativa ( $p\leq 0.01$ ) para la concentración de polifenoles y la capacidad antioxidante por el tipo de nanopartícula, concentración y la interacción. En el caso de la radícula (Cuadro 9), se puede observar que los nanomateriales afectaron significativamente ( $p\leq 0.01$ ) la concentración de flavonoides y la capacidad antioxidante por todos los métodos evaluados. Esto puede ser debido a una mayor actividad del sistema de defensa antioxidante inducida por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO). En el siguiente apartado (comparación de medias), discutimos a detalle los impactos generados por fuente de variación y la interacción.

**Cuadro 8.** Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de germinados (plúmula) sometidos a diferentes tratamientos y concentraciones con compuestos de Zn.

FV	GL	Fen. P ( mg GAE kg <sup>-1</sup> )	Flav.P (mg CE/100 g)	Tan. P (mg/100g)	DPPH.P (μmolTE/100g)	ABTS.P (μmolTE/100g)	FRAP.P (μmolTE/100g)
<b>Nanopartículas</b>	2	342115.41**	839.61*	105285.79**	7340119.71**	748632.51**	179340041.8**
<b>Concentración</b>	5	513836.75**	1298.08**	79659.16**	5089875.85**	3106469.02**	46025238.4**
<b>Nps*Conc</b>	10	163970.39**	878.72**	45298.79**	8340002.40**	3942579.96**	38415988.8**
<b>Error</b>	36	8196.75	33.45	465.16	30152.1	60860.18	149563.8
<b>C.V.</b>		8.75	11.48	5.83	4.47	4.80	6.29

\*, \*\*= Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente; FV= Fuentes de variación; G.L.= Grados de libertad; Fen.P= Fenoles en Plúmula; Flav.P= Flavonoides en Plúmula; Tan.P= Taninos en Plúmula; DPPH.P= DPPH en Plúmula; ABTS.P= ABTS en Plúmula; FRAP.P= FRAP en Plúmula; C.V.= Coeficiente de variación.

**Cuadro 9.** Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de germinados (raíz) sometidos a diferentes tratamientos y concentraciones con compuestos de Zn.

FV	GL	Fen. R ( mg GAE kg <sup>-1</sup> )	Flav.R (mg CE/100 g)	Tan. R (mg/100g)	DPPH.R (μmolTE/100g)	ABTS.R (μmolTE/100g)	FRAP.R (μmolTE/100g)
<b>Nanopartículas</b>	2	126730.05	735.21**	41577.33	41302040.82**	3702967.95**	92145717.9**
<b>Concentración</b>	5	321445.79	1203.24**	36190.74	6370408.13**	1687618.94**	25220412.5**
<b>Nps*Conc</b>	10	561380.48*	1135.06**	97280.41	6171608.99**	2732087.21**	11705126.9**
<b>Error</b>	36	264338.67	38.83	52886.69	1259275.7	622035.21	1325032.9
<b>C.V.</b>		56.18	8.72	50.93	25.33	15.21	20.92

\*, \*\*= Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente; FV= Fuentes de variación; G.L.= Grados de libertad; Fen.R= Fenoles en Raíz; Flav.R= Flavonoides en Raíz; Tan.R= Taninos en Raíz; DPPH.R= DPPH en Raíz; ABTS.R= ABTS en Raíz; FRAP.R= FRAP en Raíz; C.V.= Coeficiente de variación.

En este estudio, la acumulación de metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante se vio afectada por la aplicación de nanomateriales en las plántulas (Cuadro 10). Se observa que para el contenido total de fenoles en la estructura de la plúmula las NPsZnO superaron al testigo en 38%, mientras que las GNPsZnO solo fueron superiores al testigo en 19.3%. En cambio, para la raíz no se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo. Para la concentración de flavonoides en plúmula, las NPsZnO fueron superiores al testigo 36%, y con el ZnSO<sub>4</sub> solo se observa un incremento del 15.9% en comparación con el testigo, para la raíz se observó que no hay diferencias significativas entre las NPsZnO y el ZnSO<sub>4</sub>, sin embargo, estos fueron superiores en promedio 22%, con respecto al testigo, siendo las GNPsZnO donde solo se obtiene un incremento de 9% con respecto al testigo. En la concentración de taninos en plúmula, se encontró que las GNPsZnO superaron al testigo en 56%, mientras que las NPsZnO solo superaron al testigo en 35%, para raíz no hay diferencias significativas para ningún tratamiento, sin embargo, las GNPsZnO obtuvieron el mayor valor.

En las evaluaciones de capacidad antioxidante, para DPPH en ambas estructuras (plúmula y raíz) las GNPsZnO superaron al testigo en 50% y 59%, respectivamente, siendo el ZnSO<sub>4</sub> el tratamiento con los valores más bajos resultando en 26% superior al testigo (Cuadro 10). Para ABTS en plúmula no hubo diferencias significativas entre el ZnSO<sub>4</sub> y las NPsZnO, con incrementos en promedio del 16% superiores al testigo, mientras que las GNPsZnO lograron un aumento del 11.1% en referencia al testigo. En cambio, para la raíz el ZnSO<sub>4</sub> superó al testigo en 22%, no habiendo diferencias significativas entre las GNPsZnO, NPsZnO y el testigo. Para FRAP en plúmula, las GNPsZnO fueron superiores al testigo en 31%, mientras que en las NPsZnO se observa una disminución del 59.8% respecto al testigo. En el caso de la raíz, el ZnSO<sub>4</sub> resultó mejor que el testigo en 15%, en cambio, las NPsZnO redujeron en un 51.9% en comparación con el testigo.

**Cuadro 10.** Comparación de medias para concentración de polifenoles y capacidad antioxidante por el tipo de fertilizante aplicado en plúmula y radícula.

<b>Tipo de fertilizante</b>	<b>Fen. P</b>	<b>Fen. R</b>	<b>Flav. P</b>	<b>Flav. R</b>	<b>Tan. P</b>	<b>Tan. R</b>	<b>DPPH. P</b>	<b>DPPH. R</b>	<b>ABTS. P</b>	<b>ABTS. R</b>	<b>FRAP. P</b>	<b>FRAP. R</b>
Testigo	717.10 d	778.64 a	36.27 d	58.50 c	180.14 c	347.02 a	2281.60 d	2459.2 c	4352.28 c	4422.7 b	6159.3 c	6192.8 b
ZnSO <sub>4</sub>	1050.04 b	845.6 a	43.17 c	75.14 a	412.22 a	415.50 a	3341.14 c	3119.5 c	5271.31 a	5695.9 a	6711.8 b	7337.1 a
GNNPsZnO	889.52 c	1008.3 a	51.16 b	64.02 b	415.04 a	506.04 a	4583.26 a	6088.4 a	4900.85 b	5016.1 b	8977.6 a	6195.2 b
NPsZnO	1163.93 a	891.3 a	56.76 a	75.04 a	281.18 b	432.83 a	3704.88 b	4081.5 b	5233.87 a	4835.9 b	2741.8 d	2974.1 c

Fen.P= Fenoles en Plúmula; Fen.R= Fenoles en Raíz; Flav.P= Flavonoides en Plúmula; Flav.R= Flavonoides en Raíz; Tan.P= Taninos en Plúmula; Tan.R= Taninos en Raíz; DPPH.P= DPPH en Plúmula; DPPH.R= DPPH en Raíz; ABTS.P= ABTS en Plúmula; ABTS.R= ABTS en Raíz; FRAP.P= FRAP en Plúmula; FRAP.R= FRAP en Raíz. Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05)

En el Cuadro 11, se pueden observar los resultados obtenidos por los niveles de concentración aplicados, para el contenido total de fenoles en la estructura de la plúmula, la concentración a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  obtuvo el mayor valor, siendo superior al testigo en 16%, en cambio, en la concentración  $10 \text{ mg L}^{-1}$  se observa una disminución del 31%, respecto al testigo. Para fenoles en radícula no hay diferencias significativas entre las concentraciones aplicadas y el testigo. En flavonoides en plúmula, se observa que no hay diferencias significativas entre la concentración a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  y el testigo, siendo estos los valores más altos obtenidos en esta prueba, sin embargo, a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  se observó una disminución del 46%, en comparación con el testigo. Para flavonoides en la raíz, el testigo fue superior a todas concentraciones, pero a  $15 \text{ mg L}^{-1}$  tan solo fue inferior al testigo en 10%, mientras que a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  se observa una disminución del 35%, respecto al testigo. En la concentración de taninos en la plúmula, las concentraciones a  $15$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  mostraron los mejores resultados, siendo superiores al testigo en 55 y 56%, respectivamente, mientras que a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  se observa un aumento del 42% respecto al testigo. Para la concentración de taninos en raíz no hubo diferencia significativa entre las concentraciones aplicadas.

Para DPPH en plúmula, se observa que la concentración a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  fue superior 37% al testigo, mientras que a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  solo se observa un aumento del 7.48% respecto al testigo. Para DPPH en raíz, la concentración a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  superó al testigo en 29% y a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  se presentó una disminución del 14% en comparación con el testigo. Para ABTS para ambas estructuras (plúmula y raíz) se observa que la concentración a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  obtiene los mejores resultados siendo superior al testigo en un 9 y 16%, respectivamente, en cambio para plúmula hay una disminución del 18% a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  y en raíz a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  hay una disminución del 4.98% respecto al testigo. Para FRAP en la estructura de la plúmula, los resultados indican que la concentración a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  fue la mejor, siendo superior al testigo en 52%, mientras que a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  se observa una disminución del 26% en comparación con el testigo. En cambio, en la estructura de la raíz el mejor valor se obtuvo a una concentración de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , siendo este valor 40% superior al testigo, por otra parte, a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  hay una reducción del 6.7% comparado con el testigo.

**Cuadro 11.** Comparación de medias de la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante por el nivel de concentración para plúmula y raíz.

Concentración	Fen. P	Fen. R	Flav. P	Flav. R	Tan. P	Tan. R	DPPH. P	DPPH. R	ABTS. P	ABTS. R	FRAP. P	FRAP. R
Testigo	1200.30 b	1291.0 a	68.31 a	89.67 a	203.52 c	569.4 a	3124.80 e	4049.2 bc	5497.4 b	4964.9 ab	4231.3 e	4479.2 bc
5	888.33 cd	800.9 a	50.79 b	69.19 c	362.90 b	462.7 a	5027.18 a	4287.2 abc	5130.2 c	5076.2 ab	8224.9 b	8693.9 a
10	826.91 d	865.0 a	36.35 d	58.22 d	380.30 b	401.1 a	3377.44 d	3473.3 c	4664.3 de	4717.3 b	8827.0 a	4178.2 c
15	957.90 c	780.8 a	45.24 bc	80.06 b	455.93 a	406.0 a	3668.89 c	3930.1 bc	4953.7 cd	5370.3 ab	6995.1 c	5224.1 bc
20	1443.05 a	895.4 a	60.14 a	68.33 c	463.00 a	456.2 a	4577.49 b	5773.3 a	6088.3 a	5955.7 a	3109.2 f	5845.7 b
25	890.49 cd	857.4 a	41.37 cd	62.93 cd	351.27 b	413.4 a	3482.77 cd	5065.6 ab	4478.3 e	5011.2 ab	5474.8 d	4591.5 bc

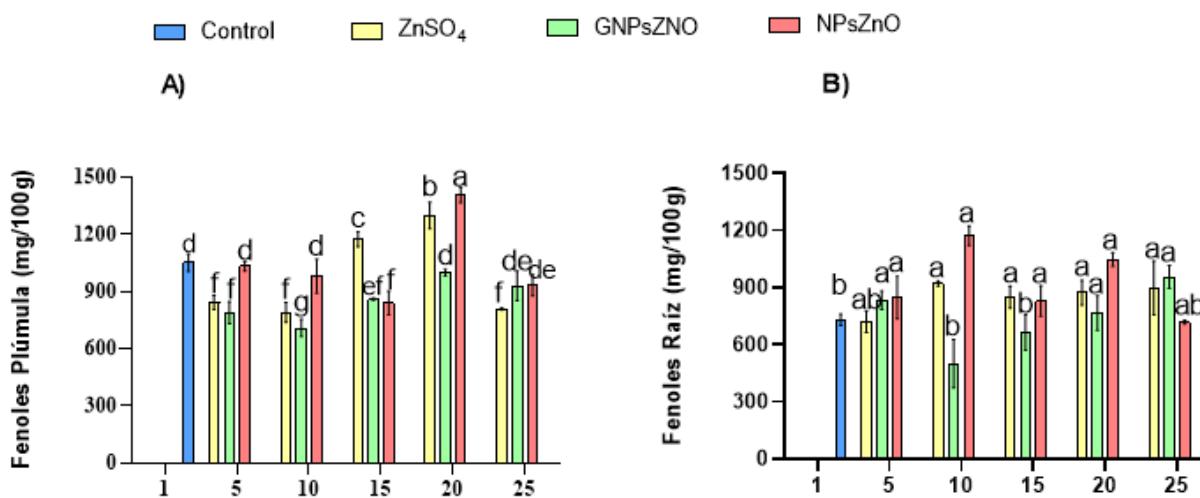
Fen.P= Fenoles en Plúmula; Fen.R= Fenoles en Raíz; Flav.P= Flavonoides en Plúmula; Flav.R= Flavonoides en Raíz; Tan.P= Taninos en Plúmula; Tan.R= Taninos en Raíz; DPPH.P= DPPH en Plúmula; DPPH.R= DPPH en Raíz; ABTS.P= ABTS en Plúmula; ABTS.R= ABTS en Raíz; FRAP.P= FRAP en Plúmula; FRAP.R= FRAP en Raíz. Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Un estudio realizado en plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*), demostró que la absorción de Zn en raíces y brotes a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mg de Zn/Kg de suelo, resultó en altos niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), estos resultados fueron más efectivos con el uso de NPsZnO para aumentar la capacidad antioxidante, sugiriendo que este efecto se debió a la acumulación de Zn en los tejidos mediante la absorción de iones de Zn disueltos (Ruiz Torres et al., 2021).

En todos los sistemas biológicos debe existir un equilibrio redox, esto para que haya un equilibrio entre las reacciones oxidativas y reductoras, con la finalidad de lograr las condiciones adecuadas para la vida. Las alteraciones en la homeostasis redox son causadas por una acumulación de moléculas oxidantes, ya sea por sobreproducción o pérdida de la capacidad reductora celular (San Miguel et al., 2009). Las ERO son algunos de los oxidantes más comunes en las células, estas se forman por la reducción parcial del oxígeno molecular a superóxido ( $O^{2-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peróxidos lipídicos (ROOH), o los correspondientes radicales hidroxilos (OH), entre otros. Dado que los lípidos son responsables de mantener la integridad de las membranas celulares, la peroxidación extensiva de los lípidos altera el ensamblaje, la composición, la estructura y la dinámica de las membranas lipídicas. Como compuestos altamente reactivos, los peróxidos lipídicos también son capaces de propagar una mayor generación de ERO, o degradarse en compuestos reactivos capaces de entrecruzar el ADN y las proteínas (Gaschler et al., 2017).

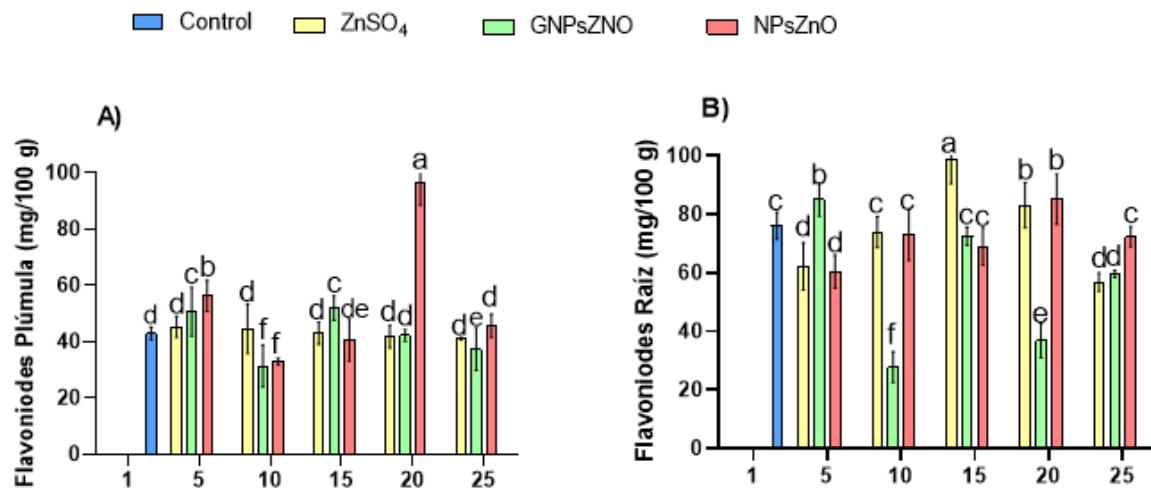
### Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en el contenido total de fenoles

Los resultados de la interacción de las fuentes de variación (Figura 8), muestran que para la plúmula (Figura 8A) el mejor tratamiento son las NPsZnO a 20 mg L<sup>-1</sup> siendo superiores al testigo en un 25%, mientras que las GNPsZnO a 10 mg L<sup>-1</sup> es donde se observa una disminución del 32.6% respecto al testigo. En la raíz (Figura 8B), no se observan diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos, sin embargo, las NPsZnO a 10 mg L<sup>-1</sup> es donde se obtiene el valor más alto siendo 57% superior al tratamiento con GNPsZnO a la misma concentración.



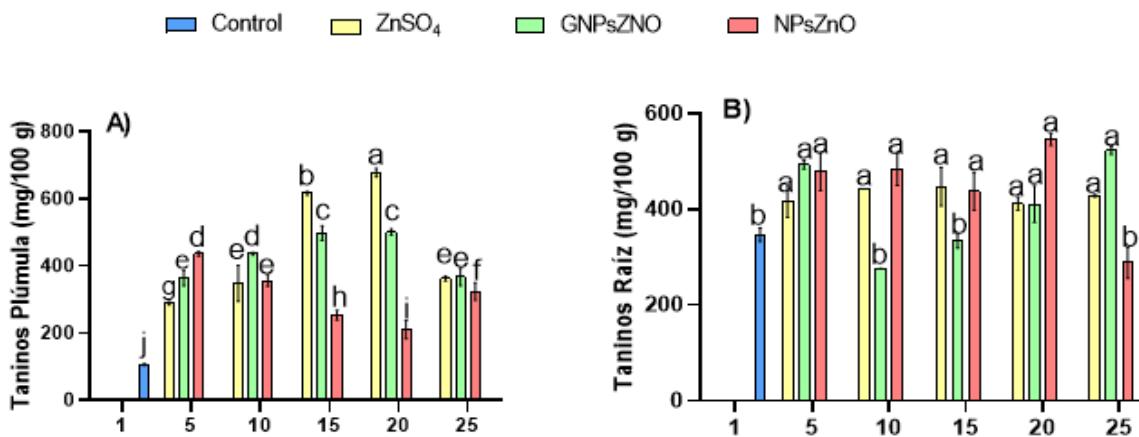
**Figura 8.** Concentración de fenoles en plúmula (A) y raíz (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las cuatro repeticiones (n=3). Las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

En la Figura 9 se presentan los resultados para la concentración de flavonoides, se observa que para la estructura de plúmula (Figura 9A), las NPsZnO a 20 mg L<sup>-1</sup> obtuvieron los valores más altos, siendo superiores al testigo en 56%. En cambio, con las GNPsZnO y las NPsZnO a 10 mg L<sup>-1</sup> se observa una disminución en promedio del 24.5% respecto al testigo. Para estructura de raíz (Figura 9B), el mejor resultado se obtuvo con el ZnSO<sub>4</sub> a 15 mg L<sup>-1</sup>, superando al testigo en 22%, mientras que con las GNPsZnO a 10 mg L<sup>-1</sup> hay una reducción del 63.5% respecto al testigo.



**Figura 9.** Concentración de flavonoides en plúmula (A) y raíz (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05).

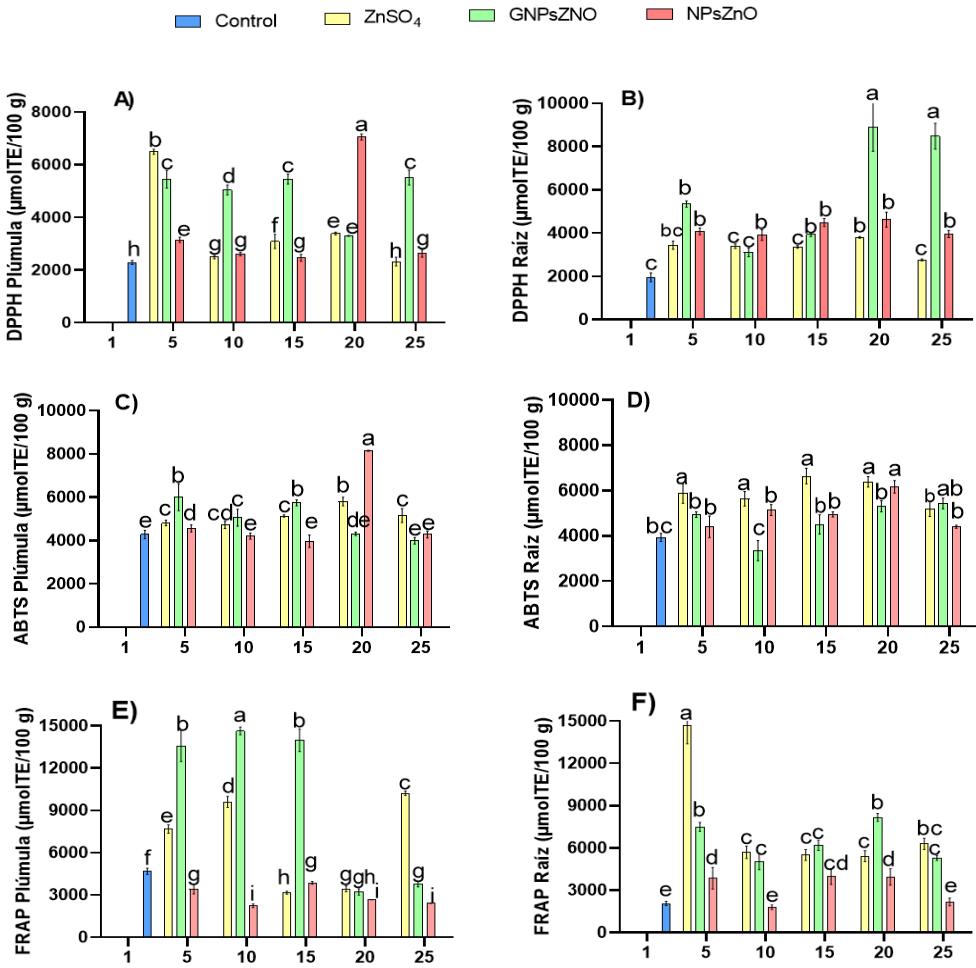
Según los resultados obtenidos se muestra que, para la concentración de taninos (Figura 10) en la estructura de plúmula (Figura 10A), el ZnSO<sub>4</sub> a una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup>, resulta con los valores más altos comparados con el testigo, siendo este superior en un 84%, mientras que con las NPsZnO a esta misma concentración se redujeron en 68.9% en comparación con el ZnSO<sub>4</sub>. Por otra parte, en la estructura de raíz (Figura 10B) no hay diferencia significativa para la mayoría de las interacciones, sin embargo, las NPsZnO a una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup> obtuvieron el valor más alto, superando al testigo en 36%, en cambio con las GNPsZnO a 10 mg L<sup>-1</sup> se observa una reducción del 20% en comparación con el testigo.



**Figura 10.** Concentración de taninos en plúmula (A) y raíz (B) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05).

#### Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en la capacidad antioxidante

En la Figura 11, se presentan los resultados obtenidos de la interacción del tipo de fertilizante y las diferentes concentraciones para la capacidad antioxidante de los germinados de cebada sometidos a nanomateriales, se puede observar que, para DPPH en la estructura de plúmula (Figura 11A) las mejores concentraciones se presentaron con las NPsZnO a 20 mg L<sup>-1</sup>, siendo superiores al testigo en 67%, en cambio, el ZnSO<sub>4</sub> a 25 mg L<sup>-1</sup> tan solo supera al testigo en 1.5%. En la raíz (Figura 11B), se observó que las GNPsZnO a concentraciones de 20 y 25 mg L<sup>-1</sup> fueron superiores en 77 y 76% en comparación con el testigo, mientras que el ZnSO<sub>4</sub> solo fue superior en 43% al testigo. Para ABTS en plúmula (Figura 11C), el mejor valor se obtuvo con las NPsZnO a de 20 mg L<sup>-1</sup>, siendo superiores en 47% al testigo, en cambio, las GNPsZnO muestran una reducción del 6.7% en comparación con el testigo. En la raíz (Figura 11D), el ZnSO<sub>4</sub> a 15 mg L<sup>-1</sup> superó al testigo en 40%, mientras que las GNPsZnO a 10 mg L<sup>-1</sup> presentaron una reducción del 14.7% comparado con el testigo. Para FRAP en plúmula (Figura 11E), los resultados indican que las GNPsZnO a 10 mg L<sup>-1</sup> son superiores al testigo en 67%, en cambio, las NPsZnO a 10, 20 y 25 mg L<sup>-1</sup> revelaron una disminución en promedio del 37.6% en comparación con el testigo. En la raíz (Figura 11F) resultó mejor el ZnSO<sub>4</sub> a 5 mg L<sup>-1</sup> superando al testigo en 85%, sin embargo, no hay diferencias significativas entre el testigo y las NPsZnO a 10 y 25 mg L<sup>-1</sup>, siendo estos valores los más bajos.



**Figura 11.** Capacidad antioxidante por el método DPPH en plúmula (A) y raíz (B), capacidad antioxidante por el método ABTS en plúmula (C) y raíz (D), capacidad antioxidante por el método FRAP en plúmula (E) y raíz (F) de germinados de cebada sometidos a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05).

Un estudio realizado en semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*) con la aplicación de nanopartículas de plata (NPsAg), reveló que las NPsAg generaron un importante incremento de radicales libres debido al estrés oxidativo, resultando en una mayor acumulación de compuestos fenólicos, logrando una inhibición del 58% y del 70% en los ensayos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DPPH, respectivamente. Además, las NPsAg mediadas por alantoína promovieron la germinación en las semillas, lo que indica su potencial como estimulantes del crecimiento de las plantas (Pustake et al., 2024). Si bien, los nanomateriales pueden llegar a generar estrés

oxidativo en plantas, es conveniente aplicar una dosis que permita estimular el crecimiento y rendimiento, además de los metabolitos secundarios sin llegar a causar fitotoxicidad.

Las nanopartículas debido a su diminuto tamaño tienen una mayor eficiencia en la generación de ERO, como los radicales superóxido y los radicales hidroxilos que inducen estrés oxidativo dentro de las células, lo que resulta en el daño de componentes celulares y finalmente la muerte celular. Frente al estrés oxidativo, se activan mecanismos de defensa como enzimas antioxidantes que a través de catálisis descomponen las ERO en moléculas no dañinas en sistemas bilógicos, por ejemplo; las catalasas descomponen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno, por su parte los metabolitos secundarios como los polifenoles en su estructura química cuentan con un grupo hidroxilo que puede ceder un átomo de hidrógeno para estabilizar radicales libres y de esta forma para contrarrestar el daño oxidativo. Con base en lo anterior, se ha demostrado que la aplicación de nanomateriales modifica las respuestas agronómicas, fisiológicas y bioquímicas con relación a componentes sintetizados a partir del metabolismo primario y modificar la calidad nutricional de las plantas mediante la alteración del contenido de carbohidratos, proteínas y minerales. En el siguiente apartado presentamos los resultados para las evaluaciones químicas.

### **Componentes químicos en las cariópsides después de la germinación**

En el Cuadro 12, se puede observar como las fuentes de variación nanopartículas, concentración y la interacción entre ellas afectó significativamente el contenido de total de proteínas solubles, azúcares totales y azúcares reductores en las cariópsides de cebada.

**Cuadro 12.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de compuestos químicos en las cariópsides que fueron sometidas a compuestos de Zn.

FV	GL	Proteínas Solubles (mg/L)	Azúcares Totales (mg/L)	Azúcares Reductores (mg/L)
Nanopartículas	3	30138.81 **	1861916.85 **	908550695 **
Concentración	4	14245.64 **	431531.91 **	1895531795 **
Nps*Conc	8	31065.71 **	162867.91 **	1142081219 **
Error	35	1743.69	18315.96	15772666
C.V.		3.37	12.99	4.21

\*, \*\*= Significativo al 0.05 y 0.01 niveles de probabilidad, respectivamente; F.V.= Fuentes de variación; G.L.= Grados de libertad; LP= Longitud de plúmula; LR= longitud de radícula; C.V.= Coeficiente de variación.

En el Cuadro 13, se presentan los resultados para la comparación de medias por el tipo de fertilizante. Para el contenido total de proteínas solubles, se observa que las GNPsZnO son superiores al testigo en 7.25%, mientras que, entre las NPsZnO y el ZnSO<sub>4</sub> no hay diferencias significativas respecto al testigo. Para el contenido de azúcares totales, el ZnSO<sub>4</sub> logra superar al testigo en 68%, mientras que las GNPsZnO y las NPsZnO superaron en promedio con 47.5% al testigo. Para el contenido de azúcares reductores, se observa que las NPsZnO logran un incremento del 23.93%, en comparación con el testigo, en cambio las GNPsZnO y el ZnSO<sub>4</sub> solo superan en promedio 9.7% al testigo.

**Cuadro 13.** Comparación de medias por el tipo de fertilizante para el contenido de compuestos químicos en las cariópsides que fueron sometidas a compuestos de Zn.

Tipo de fertilizante	Proteínas Solubles (mg/L)	Azúcares Totales (mg/L)	Azúcares Reductores (mg/L)
Testigo	1204.00 b	481.20 c	78367 c
ZnSO <sub>4</sub>	1226.93 b	1504.53 a	92406 b
NPsZnO	1195.07 b	878.13 b	103028 a
GNPsZnO	1298.13 a	965.87 b	93661 b

Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

Para la comparación de medias por el nivel de concentración aplicada (Cuadro 14), se observa que en el contenido de proteínas solubles el valor más alto se obtiene al aplicar 20 mg L<sup>-1</sup>, superando al testigo en 5.5%, además, se observa un efecto negativo con la concentración a 15 mg L<sup>-1</sup>, resultando 2.63% inferior al testigo. Para azúcares totales, las concentraciones 10, 20 y 25 mg L<sup>-1</sup> presentaron los valores más altos siendo en promedio 61% superiores al testigo. Por otra parte, a 5 y 15 mg L<sup>-1</sup>, se observa un incremento en promedio del 45%, en comparación con el testigo. Para el contenido de azúcares reductores, el mejor valor se observa a 15 mg L<sup>-1</sup> superando 29% al testigo, en cambio, a 20 mg L<sup>-1</sup> se presentó una reducción de 7.8% respecto al testigo.

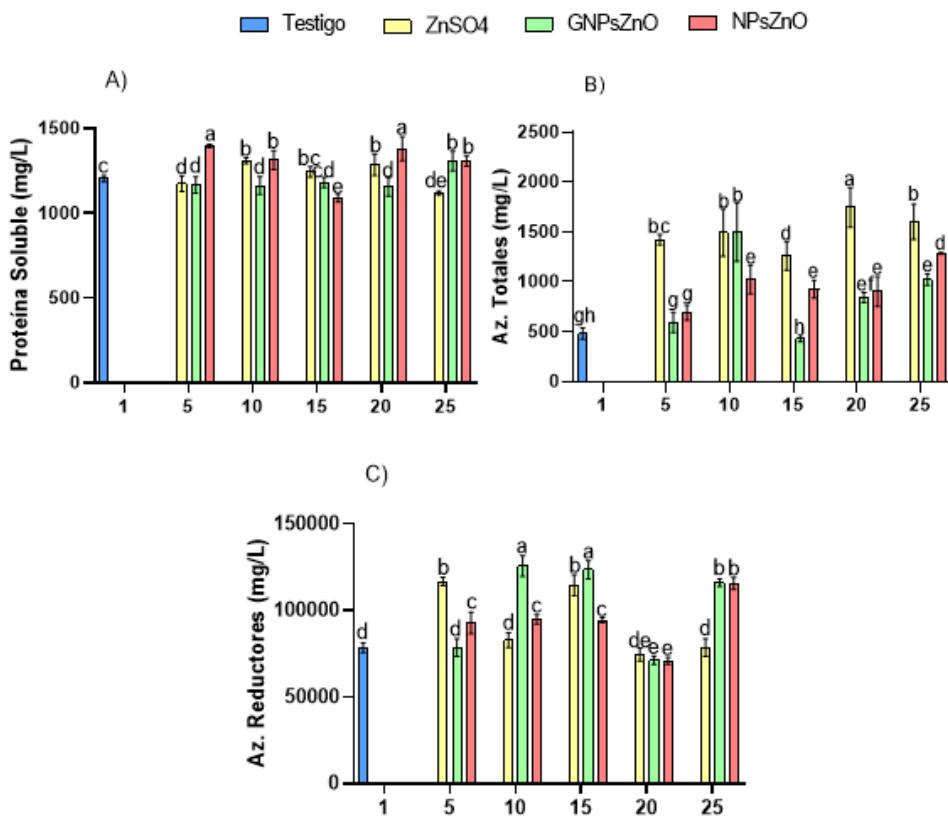
**Cuadro 14.** Comparación de medias por el nivel de concentración para el contenido total de proteínas solubles, azúcares totales y azúcares reductores en las cariópsides después de la germinación.

Concentración	Proteínas Solubles (mg/L)	Azúcares Totales (mg/L)	Azúcares Reductores (mg/L)
1	1204.00 bc	481.20 c	78367 c
5	1246.22 ab	902.31 b	96024 b
10	1262.00 ab	1338.76 a	101043 b
15	1172.22 c	872.53 b	110839 a
20	1274.44 a	1164.53 a	72228 d
25	1245.33 ab	1302.76 a	101691 b

Letras diferentes significa que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

**Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en el contenido de proteínas solubles, azúcares totales y azúcares reductores en las cariópsides después de la germinación**

En la Figura 12, se presenta la interacción entre el tipo de fertilizante y las concentraciones aplicadas, se puede observar que para proteína soluble (Figura 12A), los mejores resultados se presentan con las NPsZnO a 5 y 20 mg L<sup>-1</sup> siendo superiores al testigo en 13.3%, sin embargo, con este mismo tratamiento, pero a concentración de 15 mg L<sup>-1</sup> se presenta un efecto negativo de 9.46% respecto al testigo. Para azúcares totales (Figura 12B) el ZnSO<sub>4</sub> a 20 mg L<sup>-1</sup> supera al testigo en 51.81%, en cambio las GNPsZnO a 15 mg L<sup>-1</sup> fueron inferior al testigo en 10%. En azúcares reductores se presentó un incremento en promedio del 37% entre las GNPsZnO a 10 y 15 mg L<sup>-1</sup>, no habiendo diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, las GNPsZnO y NPsZnO a 20 mg L<sup>-1</sup> lograron una reducción en promedio del 9.28% respecto al testigo.



**Figura 12.** Interacción del tipo de fertilizante y la concentración en el contenido de proteínas solubles (A), azúcares totales (B) y azúcares reductores (C) en las cariópsides después de la germinación de semillas de cebada sometidas a diferentes tratamientos de Zn con concentraciones de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores son el promedio de las 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, P ≤ 0.05).

En un estudio realizado en semillas de fenogreco (*Trigonella foenum-graecum* L.), donde aplicaron concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg L<sup>-1</sup> durante 24 h. Se observó que el contenido de carbohidratos aumentó significativamente con el aumento de la concentración de NPsZnO, después de eso, se detectó una tendencia a la disminución, pero aún superior al control. En cuanto al contenido de proteína total, se logró una tendencia creciente y luego decreciente similar con el aumento de la concentración de NPsZnO, excepto a 50 mg L<sup>-1</sup> que disminuyó no significativamente en relación con el control. El tratamiento con 30 mg L<sup>-1</sup> de NPsZnO fue el más efectivo, y aumentó los contenidos de carbohidratos y proteínas en un 50.6 y 52.8%, respectivamente, con respecto al control (Elsherif et al., 2023).

Los incrementos en el contenido de carbohidratos y azúcares, se debe a que el Zn es un microelemento esencial para la nutrición de las plantas y se considera un componente

fundamental de varios sistemas enzimáticos. Este micronutriente es el único metal que se requiere en las seis clases de enzimas, y contribuye a la regulación del crecimiento, la síntesis de proteínas, la producción de energía, la activación de enzimas, la expresión génica, la actividad fitohormonal, la fotosíntesis, el metabolismo de carbohidratos, la fertilidad, la producción de semillas y la defensa contra enfermedades. El metabolismo de las proteínas, los hidratos de carbono y las auxinas, así como el correcto funcionamiento de los procesos reproductivos, se ven afectados negativamente por la falta de Zn (Almendros et al., 2022).

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que la aplicación de compuestos de Zn durante la imbibición de semillas es un método efectivo para lograr la biofortificación de Zn, además de modificar la germinación y las respuestas bioquímicas de los germinados. Las GNPsZnO a 25 mg L<sup>-1</sup> fue el tratamiento más efectivo para estimular positivamente la germinación, mientras que el ZnSO<sub>4</sub> a 15 mg L<sup>-1</sup> presentó una disminución del 14% con respecto al testigo. La disminución en la germinación al usar ZnSO<sub>4</sub> se reflejó en menor acumulación de peso seco con reducciones del 20 y 22% a 10 y 15 mg L<sup>-1</sup>. La respuesta negativa del ZnSO<sub>4</sub> posiblemente se debió a una mayor acumulación de Zn, ya que fue el compuesto que más se absorbió y pudo eso resultar en un efecto fitotóxico. Por consecuencia de la absorción de Zn, todos los materiales de Zn aplicados mejoraron la concentración de polifenoles en la plúmula y radícula, lo que resultó en incrementos de la capacidad antioxidante. Cabe señalar, que la aplicación de GNPsZnO a concentraciones de 10, 20 y 25 mg L<sup>-1</sup> disminuyeron considerablemente los flavonoides en raíz, esto en comparación con el testigo y lo demás tratamientos. En cuanto a los componentes primarios, se logró modificar la concentración de proteína soluble con las NPsZnO a 5 y 20 mg L<sup>-1</sup>, mientras que, para azúcares totales el ZnSO<sub>4</sub> a 20 mg L<sup>-1</sup> resulta más favorable y para azúcares reductores se presentó un mayor incremento con GNPsZnO a 10 y 15 mg L<sup>-1</sup>. Si bien, las respuestas fisiológicas y bioquímicas de los germinados se vieron modificados por la imbibición de las semillas con los compuestos de Zn, no se identificó una tendencia condicionada por la aplicación del tratamiento y/o la concentración, por ello consideramos necesario realizar más investigaciones para evaluar la eficacia de enfoques alternativos de biofortificación agronómica con el uso de nanofertilizantes.

Parte de la metodología de este trabajo de investigación fue reportada como artículo de divulgación titulado “Impregnación de semillas con nanomateriales metálicos de óxido de Zn”, publicado en la revista Agro-divulgación con el número de DOI: <https://doi.org/10.54767/ad.v4i6.410>.

## REFERENCIAS

- Ali, M. B., Iftikhar, T., and Majeed, H. 2024. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles for the industrial biofortification of (*Pleurotus pulmonarius*) mushrooms. *Heliyon*, 10(19).
- Alloway, B. J. 2008. Zinc in Soils and Crop Nutrition. International Zinc Association and International Fertilizer Association, 16.
- Almendros, P., Obrador, A., Álvarez, J., and Machado, R. 2014. Biofortificación de cereales con micronutrientes.
- Almendros, P., González, D., Fernández, M. D., García-Gómez, C., and Obrador, A. 2022. Both Zn biofortification and nutrient distribution pattern in cherry tomato plants are influenced by the application of ZnO nanofertilizer. *Heliyon*, 8(3).
- Álvarez Ariza, A. A., and Cesar Solano, M. E. 2019. Déficit de zinc y desnutrición: La fortificación como solución (Doctoral dissertation, Universidad del Sinú, seccional Cartagena).
- Arreola, J. P. S., Chávez, E. S., Quezada, G. D. Á., Muñoz, C. H. A., and Flores, P. B. Z. 2015. Biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas y su impacto en la nutrición y salud humana: Micronutrient biofortification in agricultural crops and their impact on human nutrition and health. *TECNOCIENCIA Chihuahua*, 9(2), 67-74.
- Asmat-Campos, D., Juárez-Cortijo, L., and Delfín-Narciso, D. 2023. ZnO nanoparticles and their effect as nanofertilizers: In vitro evaluation in *Chenopodium quinoa* seeds. *LACCEI*, 1(8).
- Avnee, Sood, S., Chaudhary, D. R., Jhorar, P., and Rana, R. S. 2023. Biofortification: an approach to eradicate micronutrient deficiency. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1233070.
- Banuelos, G. S., and Lin, Z. Q. 2008. Development and uses of biofortified agricultural products. CRC Press.
- Barone, J., Duarte, E., and Luna, C. 2016. Determinación de la eficacia de métodos de evaluación de calidad de semillas de especies forestales nativas de la Selva Atlántica. *Quebracho* (Santiago del Estero), 24(2), 70-71.
- Benavides-Mendoza, A., Betancourt-Galindo, R., and Francisco-Francisco, N. 2023. Impact of ZnSO<sub>4</sub> and ZnO Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth of Lettuce. *Phyton* (0031-9457), 92(6).
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Chaudhary, R., Sharma, C., Kumar, V., Rajput, V., Naik, B., Prasad, R., and Kumar, V. 2025. Millet biofortification for enhanced iron content: Roadmap for combating hidden hunger. *Journal of Agriculture and Food Research*, 101654.
- Chen, X., Ding, Y., Yang, Y., Song, C., Wang, B., Yang, S., Gong, Z. 2021. Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 53-78.
- Choukri, M., Abouabdillah, A., Bouabid, R., Abd-Elkader, O. H., Pacioglu, O., Boufahja, F., and Bourioug, M. 2022. Zn application through seed priming improves productivity and grain nutritional quality of silage corn. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(12), 103456.
- de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., and Pastore, G. M. 2021. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food chemistry*, 338, 127535.
- Deepthi, S., Srikiran, S., Satyanarayana Gupta, M., and Mulatu Kumara, A. 2023. Synthesis and Antimicrobial Activity Assay of Nanometal Oxide-Doped Liquid Crystal. *Journal of Nanomaterials*, 2023(1), 5668025.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Elsherif, D. E., Abd-ElShafy, E., and Khalifa, A. M. 2023. Impacts of ZnO as a nanofertilizer on fenugreek: some biochemical parameters and SCoT analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 52.
- 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. Fertilización foliar con nanopartículas de ZnO y su efecto en la producción, calidad biofísica y nutraceútica en frutos de nogal pecanero (*Carya illinoiensis*). *Terra Latinoamericana*, 41.
- García-López, J. I., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldívar, R. H., Díaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N. A., and Niño-Medina, G. 2018. Zinc oxide nanoparticles boosts phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum L.* during germination. *Agronomy*, 8(10), 215.
- García-López, J. I., Niño-Medina, G., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldívar, R. H., Barriga-Castro, E. D., Vázquez-Alvarado, R., and Zavala-García, F. 2019. Foliar applications of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate boosts the content of bioactive compounds in habanero peppers. *Plants*, 8(8), 254.
- Gaschler, M. M., and Stockwell, B. R. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425.

- Geraldo León, J. A., Vázquez-Duhalt, R., and Juárez-Moreno, K. O. 2022. Desbalance del sistema antioxidante causado por la exposición a nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre. Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología, 15(29).
- González, Z. F., Font, A. J. Q., Ochoa, M. Y. M., Rodríguez, E. C., and Estrada, A. M. B. 2020. La malnutrición; problema de salud pública de escala mundial. Multimed, 24(1).
- 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.
- Hanif, S., Javed, R., Cheema, M., Kiani, M. Z., Farooq, S., and Zia, M. 2024. Harnessing the potential of zinc oxide nanoparticles and their derivatives as nanofertilizers: Trends and perspectives. Plant Nano Biology, 100110.
- Henao-González, D., David, D., Torres-Oquendo, J., do Amaral Sobral, P. J., and Vega-Castro, O. 2024. Design and Optimization of a Strawberry-Based Dispersion to Produce a Spray Drying Functional Powdered Product, Fortified with Folic Acid and Zinc. Food and Bioproducts Processing.
- Herrera, M. P. 2011. La biofortificación del arroz con micronutrientes: una estrategia nutricional que puede ser sostenible en Cuba. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, 21(1), 153-158.
- Hategni, N. V. F., Sohindji, F. S., Salaou, M. A., Agbandou, P. C., Azonhoumon, L. W., Tchokponhoué, D., and Achigan-Dako, E. G. 2024. Agronomic biofortification of cereals and legumes with iron, zinc, calcium and magnesium for food and nutrition security: Available options for farmers in Sub-Saharan Africa. Journal of Agriculture and Food Research, 18, 101391.
- Kadri, O., Dimkpa, C. O., Chaoui, A., Kouki, A., Amara, A. B. H., and Karmous, I. 2024. Zinc oxide nanoparticles at low dose mitigate lead toxicity in pea (*Pisum sativum L.*) seeds during germination by modulating metabolic and cellular defense systems. Journal of Agriculture and Food Research, 18, 101482.
- Karaduman, Y., Gülbändilar, A., Akın, A., Doğan, S., and Savaşlı, E. 2024. Zinc and Selenium Biofortification of Sourdough Breads with Agronomically Biofortified Whole Wheat Flour. Journal of Cereal Science, 103952.
- King, J. C., Brown, K. H., Gibson, R. S., Krebs, N. F., Lowe, N. M., Siekmann, J. H., and Raiten, D. J. 2016. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)zinc review. The Journal of nutrition, 146(4), 858S-885S.
- Kumar, R. R., Singh, S. P., Rai, G. K., Krishnan, V., Berwal, M. K., Goswami, S., and Praveen, S. 2022. Iron and zinc at a cross-road: a trade-off between micronutrients

- and anti-nutritional factors in pearl millet flour for enhancing the bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*, 111, 104591.
- Kumar, N., Samota, S. R., Venkatesh, K., and Tripathi, S. C. 2023. Global trends in use of nano-fertilizers for crop production: Advantages and constraints A review. *Soil and Tillage Research*, 228, 105645.
- Kuvelja, A., Morina, F., Mijovilovich, A., Bokhari, S. N. H., Konik, P., Koloniuk, I., and Küpper, H. 2024. Zinc priming enhances *Capsicum annuum* immunity against infection by *Botrytis cinerea* from the whole plant to the molecular level. *Plant Science*, 343, 112060.
- López-Contreras, J. J., Zavala-García, F., Urias-Orona, V., Martinez-Avila, G. C. G., Rojas, R., and Guillermo, N. M. 2015. Chromatic, phenolic and antioxidant properties of Sorghum bicolor genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 366-370.
- Lucero, A. Y. 2014. Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 463-472.
- Magdaleno-García, G., Juárez-Maldonado, A., Betancourt-Galindo, R., González-Morales, S., Sánchez-Vega, M., and Méndez-López, A. 2023. Zinc oxide nanoparticle morphology modify germination and early growth of bell pepper seedlings. *Biotechnia*, 25(3), 5-15.
- Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N. 2013. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5), 1149-1154.
- Neira-Vielma, A. A., Meléndez-Ortiz, H. I., García-López, J. I., Sánchez-Valdés, S., Cruz-Hernández, M. A., Rodríguez-González, J. G., and Ramírez-Barrón, S. N. 2022. Green synthesis of silver nanoparticles using pecan nut (*Carya illinoiensis*) shell extracts and evaluation of their antimicrobial activity. *Antibiotics*, 11(9), 1150.
- 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.
- Pustake, S. O., Patil, S. C., Kirdat, P. N., Kulkarni, A. S., Patil, P. S., Dandge, P. B., and Sonawane, K. D. 2024. Bacterial allantoin mediated optimally biosynthesized silver nanoparticles exhibit antioxidant, antibacterial, and seed germination promoting activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 62, 103448.
- Quirino-García, A., Martínez-Alonso, C., López, J. E. S., Villamar, M. V., Rodríguez, M. E., and Peralta, M. D. L. Á. M. 2024. Synthesis of nano-zinc oxide by conventional

- chemical precipitation vs microwaves and its effect on the germination of cucumber (*Cucumis sativus*) seeds. *Results in Chemistry*, 10, 101720.
- Reed, R. B., Ladner, D. A., Higgins, C. P., Westerhoff, P., and Ranville, J. F. 2012. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), 93-99.
- Rodriguez-Salinas, P. A., Zavala-García, F., Urías-Orona, V., Muy-Rangel, D., Heredia, J. B., and Nino-Medina, G. 2020. Chromatic, nutritional and nutraceutical properties of pigmented native maize (*Zea mays L.*) genotypes from the northeast of Mexico. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45, 95-112.
- Ruiz-Torres, N., Flores-Naveda, A., Barriga-Castro, E. D., Camposeco-Montejo, N., Ramírez-Barrón, S., Borrego-Escalante, F., and García-López, J. I. 2021. Zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate impact physiological parameters and boosts lipid peroxidation in soil grown coriander plants (*Coriandrum sativum*). *Molecules*, 26(7), 1998.
- Saini, S., Kumar, P., Sharma, D. P., Sharma, N. C., Chauhan, A., and Shandil, D. 2024. Organic Zn and nano-Zn amino acids chelates modulate quality growth attributes and antioxidants activity for biofortified apple (*Malus x domestica Borkh.*) production. *Scientia Horticulturae*, 337, 113594.
- Sainz Mendoza, L. 2019. Efecto comparativo de diferentes formas de Zn, en la biofortificación de tomate cherry (*Lycopersicon esculentum Mill.*) en condiciones de invernadero.
- Salama, D. M., Osman, S. A., Abd El-Aziz, M. E., Abd Elwahed, M. S., and Shaaban, E. A. 2019. Effect of zinc oxide nanoparticles on the growth, genomic DNA, production and the quality of common dry bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101083.
- San-Miguel, A., and Martin-Gil, F. J. 2009. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), 106-113.
- Stanton, C., Sanders, D., Krämer, U., and Podar, D. 2022. Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification. *Molecular Plant*, 15(1), 65-85.
- Tripathi, S., Mahra, S., Sharma, S., Mathew, S., and Sharma, S. 2024. Interaction of Silver Nanoparticles with Plants: A Focus on the Phytotoxicity, Underlying Mechanism, and Alleviation Strategies. *Plant Nano Biology*, 100082.
- Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., and Campaña Marrero, I. R. 2017. Estrés oxidativo. *Correo científico médico*, 21(1), 171-186.

- Xu, X., Zhao, C., Qian, K., Sun, M., Hao, Y., Han, L., and Xing, B. 2022. Physiological responses of pumpkin to zinc oxide quantum dots and nanoparticles. Environmental Pollution, 296, 118723.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, 64(4), 555-559.