

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Impacto de la Aplicación Foliar de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y  $\text{NPsCu}$  en Parámetros Agronómicos y la Peroxidación de Lípidos en Plantas de Espinaca

Por:

**OSWALDO FUENTES MONTERROSAS**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Impacto de la aplicación foliar de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y  $\text{NPsCu}$  en Parámetros Agronómicos y la Peroxidación de Lípidos en Plantas de Espinaca

Por:

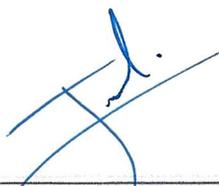
**OSWALDO FUENTES MONTERROSAS**

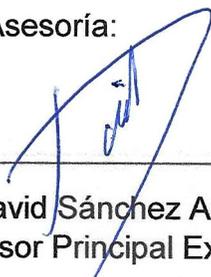
TESIS

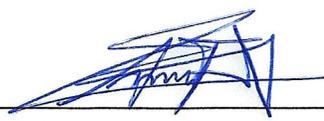
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Josué Israel García López  
Asesor Principal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. David Sánchez Aspeytia  
Asesor Principal Externo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Flores Naveda  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Perpetuo Álvarez Vázquez  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2024

## Declaración de no plagio

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

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

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

Pasante



Oswaldo Fuentes Monterrosas

Firma y Nombre

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios, quien ha sido mi guía y fortaleza a lo largo de este camino me ha permitido superar cada obstáculo y seguir adelante en mi búsqueda del conocimiento, por brindarme la salud, la sabiduría y la perseverancia necesarias para alcanzar esta meta.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a mi alma mater, por brindarme la oportunidad de formarme académica y profesionalmente en un entorno de excelencia y compromiso con el conocimiento.

Quiero dedicar un agradecimiento especial a mi madre, Alfonsa Monterrosas Patricio, cuyo amor, apoyo y sacrificio han sido la base sobre la cual he construido este logro académico.

Este logro es tan tuyo como mío. Con todo mi amor y cariño, gracias, mamá.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi hermana, Magdalena Angélica Fuentes Monterrosas, por su apoyo incondicional y su constante aliento a lo largo de este camino. Tu dedicación, tu esfuerzo y tu fe en mis capacidades me han inspirado a dar lo mejor de mí y a no rendirme nunca. Eres no solo una hermana, sino también una amiga y una consejera en quien siempre puedo confiar.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi asesor y profesor, Dr. Josué Israel García López, cuya guía y apoyo han sido fundamentales para la realización. Gracias por el tiempo brindado, sin su apoyo, este logro no habría sido posible. Por ello le expreso mi más profunda gratitud.

A mis Coasesores, los Dres David Sánchez Aspeytia, Antonio Flores Naveda y Perpetuo Álvarez Vázquez por brindarme su tiempo, su experiencia y conocimiento, les expreso mi más sincero agradecimiento y aprecio.

A mis Amigos Daniel Morales Menchaca, Edgar Issac Muñoz Romero y Omar López Acosta, Isaac López Madrueño, a ustedes amigos les agradezco por estar conmigo en

esta etapa, por brindarme su amistad su apoyo, por compartir conmigo alegrías, tristezas. A pesar de las adversidades ustedes fueron un apoyo incondicional en los momentos difíciles, agradezco su amistad y espero que sigamos compartiendo momentos inolvidables en el futuro, se les quiere con el alma “Buitres por siempre”.

A Agrícola San Martín por darme la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales en su organización, durante mi estadía fui testigo de la dedicación y esfuerzo por parte de todo el equipo ASM. Agradezco especialmente al Ing. Salvador Torres Musito, por su sincera amistad, sus enseñanzas, sus consejos fueron de gran apoyo, serán invaluable para mi futuro de corazón muchas gracias.

## DEDICATORIAS

A mi amada Madre Alfonsa Monterrosas Patricio, Gracias por el apoyo incondicional que siempre recibí de usted , por tanto amor, cariño, comprensión y tu paciencia, por siempre alentarme y querer lo mejor para mí, por creer en mi cuando incluso yo dudaba, desde mis primeros pasos has sido mi guía y mi inspiración, siéntase orgullosa de sus sacrificios, enseñanzas, regaños rindieron frutos, sé que estar lejos te tus seres queridos no es nada fácil, pero ha valido la pena cada día, cada año y cada segundo lo logramos Mamá.

A mis queridos Hermanos, Luz María, Andrea, María, Fidel, Jesús, Alejandro, aunque la distancia nos separe, el lazo que nos une es inquebrantable. Gracias por ser mi inspiración y por las innumerables formas en las que me han apoyado desde lejos. Sus palabras de aliento y su presencia en mi vida, aunque sea a la distancia, han sido un pilar fundamental en este recorrido cada uno de ustedes ha dejado una huella en mi corazón. su amor y apoyo han sido una fuente constante de fuerza y motivación., esperando que pronto podamos estar juntos de nuevo.

A Ingrid Samara Coronado Juárez, este logro es gracias a ti, por tu apoyo incondicional, por creer en mí, tus sacrificios, tu paciencia, comprensión y cariño me motivaron a dar lo mejor de mí, cuando estaba a punto de rendirme apareciste para darle rumbo a mi vida, con tu constante presencia, palabras de aliento y tu inquebrantable fe en mi han sido una fuente de inspiración, atesoro cada momento que has compartido conmigo, cada sonrisa y cada gesto de amor que me han motivado a seguir adelante gracias por tanto hermosa.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIAS.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN.....	x
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivo general.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Impacto de nano compuestos de Cu en plantas .....	3
2.2 Aplicaciones del Cu(OH) <sub>2</sub> en la producción de cultivos.....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1 Materiales de cobre y semillas de espinaca.....	7
3.2 Preparación de soluciones/suspensiones a base de zinc y su aplicación al suelo	7
3.3 Aplicación foliar de tratamientos y condiciones de crecimiento .....	7
3.4 Cosecha de plantas.....	8
3.5 Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	8
3.6 Contenido de MDA .....	8
3.7 Análisis estadístico .....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	10
4.1 Parámetros agronómicos .....	10
4.2 Acumulación de peróxido de hidrógeno y MDA.....	11
5. CONCLUSIONES .....	14
6. REFERENCIAS.....	15

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza en parámetros gronómicos de plantas de espinaca cultivadas con compuestos de Cu.....	10
Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para la acumulación de radicales libres (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) y peroxidación de lípidos (MDA) en plantas de espinaca cultivadas con compuestos de Cu. ....	12

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Peso seco de raíz (a), hoja (b) y acumulación de área foliar en plantas de espinaca expuestas aplicaciones foliares de 0, 25, 50 y 75 mg L<sup>-1</sup> con hidróxido de cobre Cu(OH)<sub>2</sub> y nanopartículas de cobre (NPsCu). Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05)..... 11
- Figura 2. Acumulación de peróxido de hidrógeno (a) y peroxidación de lípidos (b) en plantas de espinaca expuestas aplicaciones foliares de 0, 25, 50 y 75 mg L<sup>-1</sup> con hidróxido de cobre Cu(OH)<sub>2</sub> y nanopartículas de cobre (NPsCu). Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05)..... 12

## RESUMEN

Actualmente, se han desarrollado formulaciones alternativas de Cu dentro de las cuales destaca el Biocida comercial Kocide 2000 (Dupont), con una formulación de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  que contiene 53.8% de Cu, más O, Na, Al y Si como ingredientes inertes, con un tamaño de partícula primario entre 50 a 1000 nm. Por esta razón, en este estudio se evaluó el impacto que tiene la aplicación foliar de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y nanopartículas de óxido de cobre (NPsCu) sobre las respuestas agronómicas y bioquímicas de plantas de espinaca cultivadas en invernadero con sustrato inerte. La cosecha se realizó el día 67 después de la siembra, la acumulación de biomasa de las plantas fue utilizada para cuantificar el peso seco de hoja (PSH), peso seco de raíz (PSR) y área foliar (AF), además se determinó la acumulación de radicales libres como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y la concentración de malondialdehído (MDA). La mayor acumulación de PSR y PSD se obtuvo a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  con  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , superando en 21.1 y 47.9% al testigo y NPsCu a la misma concentración. En el área foliar se presentó una tendencia similar, a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  con  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  se obtuvo el mayor desarrollo superando en 28.1 y 9.6% al testigo y NPsCu a la misma concentración. Para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y MDA la mayor concentración se presentó con NPsCu a una concentración de  $75 \text{ mg L}^{-1}$ , con incrementos del 16.1 y 14.3% en comparación con  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  a la misma concentración. Los efectos sobre el crecimiento de las plantas pueden ser atribuido al tipo de fertilizante utilizado y su influencia en las respuestas bioquímicas al estrés oxidativo.

**Palabras clave:** *Spinacia oleracea*, óxido de cobre, acumulación de biomasa, radicales libres, peroxidación de lípidos.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cobre (Cu) en bajas concentraciones es un elemento esencial para las plantas y los animales, además se utiliza para controlar enfermedades fúngicas y bacterianas en muchas plantas de cultivo (Lasso-Robledo et al., 2022). Los nanoproductos de Cu tienen un mercado amplio en la agricultura porque se utilizan como fertilizantes y pesticidas (Rawat et al., 2019). Sin embargo, la aplicación continua de productos de cobre para controlar enfermedades de las plantas ha resultado en una contaminación ambiental que afecta la flora y la fauna (Lasso-Robledo et al., 2022).

Sin embargo, los nanomateriales han demostrado que impactan el medio ambiente de una manera diferente que sus correspondientes materiales de tamaño micro. La principal diferencia probablemente se deba a la liberación de iones (Zuverza-Mena et al., 2015). El Cu se considera un sólido estable no peligroso e insoluble en agua, sin embargo, las nanopartículas de Cu (NPsCu) se consideran inflamables y muy tóxicas para los animales (Zuverza-Mena et al., 2015). Importante es considerar que a pesar de que los nanomateriales se han utilizado ampliamente en diferentes campos, incluidos el cuidado de la salud, la electrónica y la agroindustria, se espera que se acumulen principalmente en suelos agrícolas, como resultado de una liberación antropogénica directa o como subproductos (Cota-Ruiz et al., 2020).

En atención a lo anterior, es necesario realizar estudios sobre los efectos agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en los sistemas vegetales y sus microorganismos asociados. Con base en el conocimiento de diversos autores (Pullagurala et al., 2018; Lasso-Robledo et al., 2022) y en la revisión de literatura que se ha realizado, no existen otras investigaciones que representen las interacciones de nano-fertilizantes a base de Cu en plantas de espinaca. Por tal motivo, el objetivo de este estudio es determinar el impacto de la aplicación foliar de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y NPsCu en parámetros agronómicos y bioquímicos en plantas de espinaca.

## **1.1 Hipótesis**

Ho: La aplicación foliar de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y NPsCu tiene un impacto en la acumulación de biomasa (peso seco de raíz y hoja), y área foliar, además de modificar la acumulación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y malondialdehído (MDA) en plantas de espinaca.

Hi: La aplicación foliar de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y NPsCu no impacta en la acumulación de biomasa (peso seco de raíz y hoja), ni el área foliar, ni modifica la acumulación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y malondialdehído (MDA) en plantas de espinaca.

## **1.2 Objetivo general**

Cuantificar el impacto de la aplicación foliar de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y NPsCu en la acumulación de biomasa (peso seco de raíz y hoja), área foliar, acumulación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y malondialdehído (MDA) en plantas de espinaca.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Impacto de nano compuestos de Cu en plantas

El cobre y el zinc funcionan como cofactores de importantes enzimas antioxidantes como la ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) (Sunkar, 2006). También, participan en funciones biológicas incluida la estabilización estructural de ácidos nucleicos y componentes de proteínas (Mendoza-Cozatl et al., 2005). Sin embargo, en altas concentraciones el Cu puede causar alteraciones en el desarrollo radicular, inhibición de la fotosíntesis y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Wang et al., 2015). Además, un exceso de Cu genera daños a las proteínas y los lípidos de la membrana plasmática, lo cual afecta la permeabilidad de la bicapa lipídica y genera desequilibrios en la concentración de elementos (Quartacci et al., 2001).

La peroxidación de los lípidos de membrana es un efecto dañino importante que generan las ERO. Por lo general, la peroxidación lipídica de membrana en las plantas se detecta midiendo el contenido malondialdehído (MDA) (Kong et al., 2016). El MDA, es un marcador ampliamente utilizado para medir lesiones por lípidos oxidativos causados por el estrés que ocasionan los metales pesados en plantas (Wang et al., 2017). Varios estudios, han investigado la MDA de plantas bajo diferentes condiciones de estrés. Por lo tanto, los niveles de las concentraciones de MDA son un resultado eventual de la peroxidación y la generación de ROS dentro de la célula (Tripathi et al., 2017). En este caso, puede ser interesante estudiar si las altas concentraciones de NPs Cu en las plantas de cilantro, desencadenan la producción de enzimas antioxidantes, lo que podría potencialmente disminuir la peroxidación lipídica.

Un estudio anterior demostró que la aplicación de NPs ZnO en plantas de algodón incremento la actividad de enzimas antioxidantes, incluida la superóxido dismutasa (SOD) y las peroxidases (POD), las cuales descomponen el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno reduciendo la peroxidación lipídica (Venkatachalam et al., 2017). En un estudio realizado por Nair y Chung (2015), encontraron que en plantas de *Brassica juncea* L. la aplicación

de NPs Cu redujó el contenido de clorofila, los carotenoides y el alargamiento de los brotes. Otro estudio demostró, que la aplicación foliar de nanoplaguicidas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  en hojas de lechuga indujo estrés oxidativo y activó antioxidantes y defensas de desintoxicación, lo cual resultó en el consumo de antioxidantes de bajo peso molecular, como el ácido cis-cafeico, ácido clorogénico, ácido 3,4-dihidroxicinámico y ácido dehidroascórbico, para contrarrestar el estrés oxidativo (Zhao et al., 2016); sin embargo, pocos estudios han analizado el efecto de las nanopartículas basadas en Cu en las plantas a niveles fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Cota-Ruiz et al., 2018).

La espinaca es actualmente una de las verduras más consumidas, ya que es muy rica en vitaminas y fibra y de poco aporte calórico. Sin embargo, los trabajos de investigaciones con este cultivo son pocos y no son concluyentes en la respuesta a la aplicación de nutrientes y el uso del agua (Donega et al., 2013; Pullagurala et al., 2018). En un estudio realizado por Morales et al. (2013), sometieron plantas de cilantro a nanopartículas de cerio (NPs  $\text{CeO}_2$ ) en concentraciones de 0-500  $\text{mg kg}^{-1}$ , los resultados indicaron un incremento del 10% en el alargamiento de los brotes a 125  $\text{mg kg}^{-1}$ , mientras que, a 250  $\text{mg kg}^{-1}$  se obtuvo una reducción del 15% en la biomasa de las plantas. En otra investigación, al comparar el efecto de las NPs Cu y el cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) en plantas de cilantro, a concentraciones de 20 y 80  $\text{mg kg}^{-1}$  encontraron que la exposición de NPs Cu y  $\text{CuCl}_2$  a 80  $\text{mg kg}^{-1}$  afectó el alargamiento de los brotes en 11% y 12.4%, respectivamente, en comparación con el control (Zuverza-Mena et al., 2015).

Con base en el conocimiento de diversos autores (Zuverza-Mena et al., 2015; Pullagurala et al., 2018) y en la revisión de literatura que se ha realizado, no existen otras investigaciones que representen las interacciones de nano-fertilizantes a base de Cu en plantas de cilantro. Por lo tanto, se sabe poco acerca de los cambios fisiológicos y bioquímicos inducidos por el uso NPs Cu en este cultivo.

## 2.2 Aplicaciones del Cu(OH)<sub>2</sub> en la producción de cultivos

La agricultura tradicional, ha utilizado pesticidas para reducir las pérdidas de cultivos que causan las plagas y enfermedades. Los pesticidas a base de cobre (Cu) comenzaron a usarse a fines de 1800 con la invención de la mezcla de Burdeos, una combinación de sulfato de cobre e hidróxido de calcio, que todavía está en uso (Oustriere *et al.*, 2017). Con el paso del tiempo, se han desarrollado otros productos a base de Cu como el óxido cuproso (Cu<sub>2</sub>O) y oxiclورو de cobre (Cu(OH)<sub>2</sub>·CuCl<sub>2</sub>), los cuales se han utilizado ampliamente en la protección de cultivos, lo que ha llevado a la acumulación de Cu en los suelos destinados a la producción agrícola (Zao *et al.*, 2016).

Actualmente, se han desarrollado formulaciones alternativas de Cu dentro de las cuales destaca el Biocida comercial Kocide 3000 (Dupont), con una formulación de Cu(OH)<sub>2</sub> que contiene 53.8% de Cu, más O, Na, Al y Si como ingredientes inertes, con un tamaño de partícula primario entre 50 a 1000 nm (Tan *et al.*, 2018). Las partículas de Kocide 3000, son principalmente de tamaño micrométrico, las cuales están compuestas por nano-hojas de Cu(OH)<sub>2</sub> que están unidas entre si y pueden potencialmente volver a disociarse en agua (Conway *et al.*, 2015). Este producto es considerado como uno de los compuestos de Cu más utilizados para suprimir el moho de las hojas grises, las manchas de las hojas y enfermedades bacterianas (Tan *et al.*, 2018). También, el Kocide Cu(OH)<sub>2</sub> se anuncia como una alternativa para ser utilizado como un nanofertilizante para usos agrícolas, no obstante, es de gran urgencia investigar el destino y los efectos de estos productos en plantas y otros organismos (Adeleye *et al.*, 2014, Cota-Ruiz *et al.*, 2018).

Además de considerar el uso del Cu en la agricultura, las nanopartículas de cobre (NPs Cu) son altamente reactivas en comparación con otras nanopartículas metálicas, debido a esta característica las NPs Cu encuentran una aplicación importante en sistemas de transferencia de calor, sensores, materiales de alta resistencia, catalizadores y materiales antimicrobianos (Tamilvanan *et al.*, 2014). La gran diversidad de aplicaciones de este elemento, genera una gran liberación importante de Cu que puede terminar en suelos agrícolas (Cota-Ruiz *et al.*, 2018). Las estimaciones indican que en 2010, el sector

industrial genero alrededor de 200 toneladas métricas de NPs Cu, de las cuales se calcula que 36 toneladas se acumularon en el suelo y 11 toneladas terminaron en el agua (Zuverza-Mena *et al.*, 2015). En consecuencia, se ha estimado que el 15% del total de las NPs Cu terminan en el suelo (Keller y Lazareva, 2013). De modo que, cantidades cada vez mayores de NPs Cu están ingresando en el ambiente, después de satisfacer la aplicación del consumidor final o por la aplicación deliberada en la agricultura.

No obstante, es importante tomar en cuenta que aún no se comprende bien la interacción de las NPs basadas en Cu, con los organismos vivos (Apodaca *et al.*, 2018) y, asimismo se desconoce si el uso de NPs Cu en la agricultura permitirá su entrada en la cadena alimentaria (Gardea-Torresdey *et al.*, 2014). Como es bien sabido, las interacciones que se presentan al aplicar productos químicos dirigidos a la nutrición y producción de cultivos están reguladas por las condiciones en las que se desarrolla la planta, por tal motivo, se espera que los efectos de las NPs sean dependientes del ambiente y de la especie (Pullagurala *et al.*, 2018).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales de cobre y semillas de espinaca**

Las NPsCu (27 nm) se adquirieron de Nanomateriales de investigación Inc. (Houston, TX, USA). El  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  se adquirió en CORTEVA agriscience, destacado como fungicida protector de contacto de amplio espectro y calidad superior que es eficaz contra una amplia gama de hongos, bacterias y algunos basidiomicetos.

#### **3.2 Preparación de soluciones/suspensiones a base de zinc y su aplicación al suelo**

Las NPsCu y el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  se prepararon a concentraciones de 0, 25, 50 y 75 mg L<sup>-1</sup>. Para asegurar una dispersión uniforme de los compuestos a base de Zn, las soluciones/suspensiones se prepararon en agua desionizada DI y se homogenizaron con un sonicador Autoscience AS2060B (Instrumentación Científica, Bs, As) durante 30 min a 110 voltios-3 amperios y 50 a 60 Ghz. Las plantas del tratamiento de control se trataron con agua destilada con una CE de 0.37 mS cm<sup>-1</sup>.

#### **3.3 Aplicación foliar de tratamientos y condiciones de crecimiento**

A los 15 días después de la siembra se rociaron 0.100 L de las suspensiones de Cu para cubrir el follaje de la planta. Para la aplicación foliar, se usó un rociador manual Hudson RL Flomaster de 1.2 L (Lowell, MI, USA). El experimento se realizó en invernadero, con una temperatura media de 25.4 °C y una humedad relativa del 71%. Las semillas se sembraron en bolsas de plástico negro de uso general (4.9 × 4.9 × 3.6 pulgadas) que contenían 450 g de sustrato inerte utilizando una mezcla de perlita y vermiculita (relación 1:1 volumen sustrato), material inerte de pH neutro y sin contenido de nutrientes minerales. Para la fertilización del cultivo, se aplicaron 100 mL diarios de solución nutritiva, empleando la formulación comercial de macronutrientes (FertiDrip) N11-P02-K42) en agua desionizada DI, con un pH 6.21 y conductividad eléctrica de 0.39  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ,

en cantidades iguales para cada maceta, siguiendo la recomendación del fabricante (AGROformuladora Delta, Monterrey, NL, Mex).

### **3.4 Cosecha de plantas**

La cosecha se realizó el día 67 después de la siembra, en cuanto a las variables agronómicas se registró el peso seco de hoja (PSH), peso seco de raíz (PSR) y área foliar (AF). El AF total se midió con un medidor de área LI-3100C (LICOR Biosciences, Lincoln, NE). De la cantidad total de materia seca acumulada en cada planta, la mitad fue utilizada para cuantificar la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y Malondialdehído-peroxidación lipídica (MDA), a continuación se describen las metodologías.

### **3.5 Contenido de $H_2O_2$**

El contenido de  $H_2O_2$  en las hojas utilizando el método descrito por Singh et al. (2006). Para esto se homogenizaron 0.3 g de tejido fresco con 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0.1%. Tras centrifugar a 7500 rpm durante 15 min, se añadieron 0.5 mL del sobrenadante a 0.5 mL de tampón de fosfato ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7) y 1 mL de KI 1 M. La concentración de  $H_2O_2$  fue estimada basado en la absorbancia del sobrenadante a 390 nm con base en la siguiente formula:  $(390^*/(\text{mg muestra}/\text{. Donde es el volumen del sobrenadante, y corresponde al volumen de TCA empleado en la extracción. El contenido de } H_2O_2 \text{ se expresó como microgramos por gramo de peso fresco } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ PF}).$

### **3.6 Contenido de MDA**

El contenido de MDA en los brotes se determinó según Wang et al. (2017). Para ello, 0.3 g de tejido se homogeneizaron en 3 mL de TCA al 10%, la mezcla se sometió a centrifugación durante 10 min a 12,000 rpm. Enseguida, se recuperaron 2 mL de sobrenadante y se agregaron a 4 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.6% (TBA, en TCA al 10%), y se incubó a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  en un baño de agua durante 15 min. Una vez completado el

periodo de incubación, el sobrenadante (que contenía MDA) se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 450, 532 y 600 nm. El contenido total de MDA se calculó con la siguiente fórmula:  $6.45(532-600) - 0.56(450)$ , y se expresó como nanomole por gramo de peso fresco ( $\text{nmol g}^{-1}$  PF). La determinación del contenido de MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizaron en un espectrofotómetro Thermo Spectronic BioMate3 (Rochester, NY, USA).

### **3.7 Análisis estadístico**

El cultivo se estableció utilizando un diseño completamente aleatorio, con siete tratamientos y cinco unidades experimentales para cada tratamiento (la unidad experimental consistió de una bolsa de plástico que contenían una planta de espinaca). Los resultados se informaron como media  $\pm$  desviación estándar, las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se analizaron con un ANOVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ANOVA mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ , Cuadro 1) por los tratamientos aplicados en las variables agronómicas, esto quiere decir que la respuesta de la planta depende de los compuestos de Cu aplicados durante su crecimiento. En la comparación de media se discutirán a detalle los resultados.

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza en parámetros agronómicos de plantas de espinaca cultivadas con compuestos de Cu.

\*, \*\*

FV	GL	PSH	PSR	AF
Tratamiento	6	0.13469590**	0.03529149**	143487.59**
Error	28	0.00687224	0.00285031	9547.72
CV (%)		13.94391	16.64905	10.21

Significativo al 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente; FV= Fuentes de variación; GL= Grados de libertad; CV= Coeficiente de variación; PSD= Peso seco de hojas; PSR= Peso seco de raíz; AF= Área foliar.

### 4.1 Parámetros agronómicos

La aplicación foliar de los compuestos basados en Cu en concentraciones de 0 a 75 mg L<sup>-1</sup> afectaron significativamente la biomasa de PSR, PSD y el área foliar (Figura 1(A, B y C)). La mayor acumulación de PSR y PSD se obtuvo a 50 mg L<sup>-1</sup> con Cu(OH)<sub>2</sub>, superando en 21.1 y 47.9% al testigo y NPsCu a la misma concentración. Por otra parte, se puede observar que a 75 mg L<sup>-1</sup> se redujo el PSD y PSR en ambos compuestos, la mayor disminución se presentó en NPsCu con 25 y 26.6% menos, respectivamente. Para el área foliar se presentó una tendencia similar, a 50 mg L<sup>-1</sup> con Cu(OH)<sub>2</sub> se obtuvo el mayor desarrollo superando en 28.1 y 9.6% al testigo y NPsCu a la misma concentración, respectivamente.

Resultados similares fueron reportados por Zhao *et al.* (2017), quienes mencionaron que la aplicación de compuestos de Cu en concentraciones de 2 a 20 mg no generó cambios

significativos en la tasa de crecimiento, sin embargo, concentraciones más elevadas (100 mg L<sup>-1</sup>) afectaron negativamente la biomasa acumulada en plantas de pepino. El Cu como micronutriente esencial en las plantas al participar en roles definidos para el transporte fotosintético de electrones, incluidos los fotosistemas I y II, así como en la respiración mitocondrial (Rawat et al., 2021). Sin embargo, el exceso de Cu influye negativamente en la fotosíntesis al inhibir la biosíntesis de lípidos y pigmentos (Julich et al., 2014).

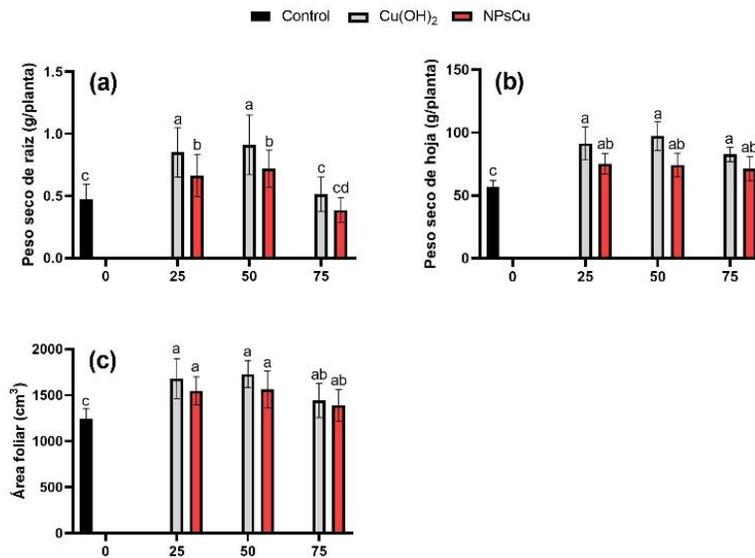


Figura 1. Peso seco de raíz (a), hoja (b) y acumulación de área foliar en plantas de espinaca expuestas aplicaciones foliares de 0, 25, 50 y 75 mg L<sup>-1</sup> con hidróxido de cobre Cu(OH)<sub>2</sub> y nanopartículas de cobre (NPsCu). Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p<0.05).

#### 4.2 Acumulación de peróxido de hidrógeno y MDA

En el Cuadro 2, se puede observar que la acumulación de peróxido de hidrógeno y MDA fueron modificados significativamente (p<0,05) por los tratamientos aplicados. Estos resultados se pueden deber a que los nanomateriales al ser absorbidos al interior de la célula vegetal pueden ocasionar estrés oxidativo, en el siguiente apartado se explicarán a detalle los efectos y sus posibles respuestas.

Cuadro 2. Cuadros medios del análisis de varianza para la acumulación de radicales libres ( $H_2O_2$ ) y peroxidación de lípidos (MDA) en plantas de espinaca cultivadas con compuestos de Cu.

FV	GL	$H_2O_2$	MDA
Tratamiento	6	0.1283**	0.2247**
Error	28	0.0055	0.0098
CV (%)		11.69	21.31

Significativo al 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente; FV= Fuentes de variación; GL= Grados de libertad; CV= Coeficiente de variación.

La mayor concentración de  $H_2O_2$  y MDA se presentó con NPsCu a una concentración de  $75\text{ mg L}^{-1}$  (Figura 2), con incrementos del 16.1 y 14.3% en comparación con  $Cu(OH)_2$  a la misma concentración.

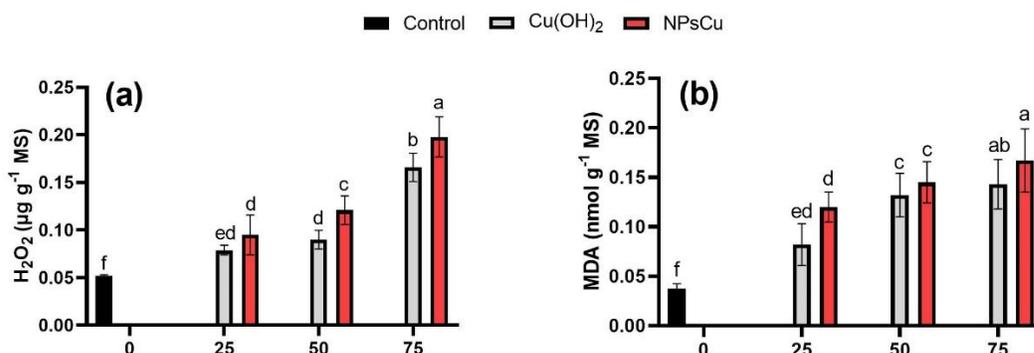


Figura 2. Acumulación de peróxido de hidrógeno (a) y peroxidación de lípidos (b) en plantas de espinaca expuestas a aplicaciones foliares de 0, 25, 50 y  $75\text{ mg L}^{-1}$  con hidróxido de cobre  $Cu(OH)_2$  y nanopartículas de cobre (NPsCu). Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias ( $n = 5$ ). Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Los resultados de este estudio revelaron que la aplicación foliar de tratamientos con compuestos de Cu incrementó la acumulación de radicales libres y peroxidación de lípidos. En plantas de cebolla, la aplicación de nanomateriales de Cu aumentó

considerablemente la actividad de enzimas antioxidantes (Wang et al., 2020). Diversos estudios han demostrado que los nanomateriales tienen efectos tanto positivos como negativos sobre las respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas cultivadas (Pullagurala et al., 2018; Li et al., 2020).

El efecto de los nanomateriales de Cu a altas concentraciones en las plantas puede generar daño celular y una mayor actividad del sistema de defensa antioxidante inducido por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lee et al., 2013). Las ROS son formas parcialmente reducidas de oxígeno atmosférico, como el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete ( $O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), que son altamente reactivos y pueden resultar en estrés oxidativo para los organismos (García-Gómez et al., 2018). En este estudio, los niveles de las concentraciones de MDA son el resultado final de la peroxidación de lípidos que es causada por especies ROS dentro de la célula (Tripathi et al., 2017).

## 5. CONCLUSIONES

En este estudio, la aplicación de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  incrementó significativamente los parámetros agronómicos, mientras que las NPsCu generaron un impacto negativo en el crecimiento de las plantas. Lo anterior, posiblemente se debe a la mayor acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y MDA con la aplicación de NPsCu en altas concentraciones.

## 6. REFERENCIAS

- Adeleye, A. S., Conway, J. R., Perez, T., Rutten, P., and Keller, A. A. 2014. Influence of extracellular polymeric substances on the long-term fate, dissolution, and speciation of copper-based nanoparticles. *Environmental science & technology*, 48(21), 12561-12568.
- Apodaca, S. A., Medina-Velo, I. A., Lazarski, A. C., Flores-Margez, J. P., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. 2018. Different forms of copper and kinetin impacted element accumulation and macromolecule contents in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Science of the Total Environment*, 636, 1534-1540.
- Conway, J. R., Adeleye, A. S., Gardea-Torresdey, J., and Keller, A. A. 2015. Aggregation, dissolution, and transformation of copper nanoparticles in natural waters. *Environmental science & technology*, 49(5), 2749-2756.
- Cota-Ruiz, K., Hernández-Viezcas, J. A., Varela-Ramírez, A., Valdés, C., Núñez-Gastélum, J. A., Martínez-Martínez, A., and Gardea-Torresdey, J. L. 2018. Toxicity of copper hydroxide nanoparticles, bulk copper hydroxide, and ionic copper to alfalfa plants: a spectroscopic and gene expression study. *Environmental pollution*, 243, 703-712.
- Cota-Ruiz, K., Ye, Y., Valdes, C., Deng, C., Wang, Y., Hernández-Viezcas, J. A., and Gardea-Torresdey, J. L. (2020). Copper nanowires as nanofertilizers for alfalfa plants: Understanding nano-bio systems interactions from microbial genomics, plant molecular responses and spectroscopic studies. *Science of the Total Environment*, 742, 140572.
- Donega, M. A., Mello, S. C., Moraes, R. M., and Cantrell, C. L. 2013. Nutrient uptake, biomass yield and quantitative analysis of aliphatic aldehydes in cilantro plants. *Industrial crops and products*, 44, 127-131.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., and Fernández, M. D. 2018. Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown in a calcareous soil and an acidic soil. *Science of the total environment*, 644, 770-780.
- Gardea-Torresdey, J. L., Rico, C. M., and White, J. C. 2014. Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environmental science & technology*, 48(5), 2526-2540.
- Julich, D., and Gäth, S. 2014. Sorption behavior of copper nanoparticles in soils compared to copper ions. *Geoderma*, 235, 127-132.
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., and Suh, S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(6), 1692.
- Kong, W., Liu, F., Zhang, C., Zhang, J., and Feng, H. 2016. Non-destructive determination of Malondialdehyde (MDA) distribution in oilseed rape leaves by laboratory scale NIR hyperspectral imaging. *Scientific reports*, 6, 35393.

Lasso-Robledo, J. L., Torres, B., and Peralta-Videa, J. R. 2022. Do all Cu nanoparticles have similar applications in nano-enabled agriculture?. *Plant Nano Biology*, 1, 100006.

Li, Z., Shi, M., Li, N., and Xu, R. 2020. Application of functional biocompatible nanomaterials to improve curcumin bioavailability. *Frontiers in Chemistry*, 8, 589957.

Morales, M. I., Rico, C. M., Hernandez-Viezcas, J. A., Nunez, J. E., Barrios, A. C., Tafoya, A., and Gardea-Torresdey, J. L. 2013. Toxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in cilantro (*Coriandrum sativum* L.) plants grown in organic soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(26), 6224-6230.

Nair, P. M. G., and Chung, I. M. 2015. The responses of germinating seedlings of green peas to copper oxide nanoparticles. *Biologia plantarum*, 59(3), 591-595.

Oustriere, N., Marchand, L., Roulet, E., and Mench, M. 2017. Rhizofiltration of a Bordeaux mixture effluent in pilot-scale constructed wetland using *Arundo donax* L. coupled with potential Cu-ecocatalyst production. *Ecological Engineering*, 105, 296-305.

Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. 2018. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant physiology and biochemistry*, 132, 120-127.

Quartacci, M.F., Cosi, E., and Navari-Izzo, F. 2001. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J. Exp. Bot.* 52, 77-84.

Rawat, S., Adisa, I. O., Wang, Y., Sun, Y., Fadil, A. S., Niu, G., and Gardea-Torresdey, J. L. 2019. Differential physiological and biochemical impacts of nano vs micron Cu at two phenological growth stages in bell pepper (*Capsicum annuum*) plant. *NanoImpact*, 14, 100161.

Rawat, S., Cota-Ruiz, K., Dou, H., Pullagurala, V. L., Zuverza-Mena, N., White, J. C., and Gardea-Torresdey, J. L. 2021. Soil-Weathered CuO Nanoparticles compromise foliar health and pigment production in spinach (*Spinacia oleracea*). *Environmental Science & Technology*, 55(20), 13504-13512.

Singh, N., Ma, L. Q., Srivastava, M., and Rathinasabapathi, B. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pterisvittata* L and *Pterisensiformis* L. *Plant Science*, 170(2), 274-282.

Tamilvanan, A., Balamurugan, K., Ponappa, K., and Kumar, B. M. 2014. Copper nanoparticles: Synthetic strategies, properties and multifunctional application. *International Journal of Nanoscience*, 13(02), 1430001.

Tan, W., Gao, Q., Deng, C., Wang, Y., Lee, W. Y., Hernandez-Viezcas, J. A., and Gardea-Torresdey, J. L. 2018. Foliar exposure of Cu(OH)<sub>2</sub> nanopesticide to basil (*Ocimum*

*basilicum*): variety-dependent copper translocation and biochemical responses. Journal of agricultural and food chemistry, 66(13), 3358-3366.

Tripathi, D. K., Mishra, R. K., Singh, S., Singh, S., Singh, V. P., Singh, P. K., and Pandey, A. C. 2017. Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles phytotoxicity in wheat seedlings: implication of the ascorbate-glutathione cycle. Frontiers in plant science, 8, 1.

Venkatachalam, P., Priyanka, N., Manikandan, K., Ganeshbabu, I., Indiraarulsevi, P., Geetha, N., and Sahi, S. V. 2017. Enhanced plant growth promoting role of phycomolecules coated zinc oxide nanoparticles with P supplementation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant physiology and biochemistry, 110, 118-127.

Wang, J., Liu, S., Li, C., Wang, T., Zhang, P., and Chen, K. 2017. PnLRR-RLK27, a novel leucine-rich repeats receptor-like protein kinase from the Antarctic moss *Pohlia nutans*, positively regulates salinity and oxidation-stress tolerance. PloS one, 12(2), e0172869.

Wang, S., Liu, H., Zhang, Y., and Xin, H. 2015. The effect of CuO NPs on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. Environmental toxicology and chemistry, 34(3), 554-561.

Wang, Y., Deng, C., Cota-Ruiz, K., Peralta-Videa, J. R., Sun, Y., Rawat, S., and Gardea-Torresdey, J. L. 2020. Improvement of nutrient elements and allicin content in green onion (*Allium fistulosum*) plants exposed to CuO nanoparticles. Science of the Total Environment, 725, 138387.

Zhao, L., Hu, Q., Huang, Y., Fulton, A. N., Hannah-Bick, C., Adeleye, A. S., and Keller, A. A. 2017. Activation of antioxidant and detoxification gene expression in cucumber plants exposed to a Cu(OH)<sub>2</sub> nanopesticide. Environmental Science: Nano, 4(8), 1750-1760.

Zhao, L., Huang, Y., Hannah-Bick, C., Fulton, A. N., and Keller, A. A. 2016. Application of metabolomics to assess the impact of Cu(OH)<sub>2</sub> nanopesticide on the nutritional value of lettuce (*Lactuca sativa*): enhanced Cu intake and reduced antioxidants. NanoImpact, 3, 58-66.

Zuverza-Mena, N., Medina-Velo, I. A., Barrios, A. C., Tan, W., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. 2015. Copper nanoparticles/compounds impact agronomic and physiological parameters in cilantro (*Coriandrum sativum*). Environmental Science: Processes & Impacts, 17(10), 1783-1793.