

EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS SOBRE EL PERFIL PROTEICO DE VEGETALES CON INTERÉS COMERCIAL EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

Valle García, Jessica Denisse (1), Vázquez Núñez, Edgar (2), Castellano Torres, Laura Edith (2)

¹ [Licenciatura en Ingeniería Química Sustentable, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [vallegj2013@licifug.ugto.mx]

² [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [edgar.vazquez@ugto.mx], [laedcato@ugto.mx]

Resumen

Se analizó el efecto de la presencia de nanopartículas de titanio sobre la germinación, crecimiento y expresión de proteínas de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) y brócoli (*Brassica oleracea itálica*) incubadas durante 14 días. Las semillas fueron inmersas en soluciones de nanopartículas a concentraciones de 50 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹ y 1000 mg L⁻¹ e incubadas a 28°C en cajas Petri; se estimó la tasa de germinación y registró la longitud de raíz. Se tomaron muestras correspondientes a cada día de medición (0, 3, 7 y 14) y posteriormente fueron almacenadas a -20 °C. Se tomaron muestras para los tratamientos control y 1000 mg/L de los días 0, 3 y 7; se extrajo la proteína y analizó el perfil proteico, empleando electroforesis. Se encontró un efecto de las nanopartículas sobre la morfometría y tasa de germinación ya que inhibían el crecimiento y longitud de raíz. Respecto al análisis preliminar del perfil proteico, fue posible determinar el patron proteico para todas las muestras, se presume que podría haber afectación en la concentración de algunas proteínas para las muestras analizadas.

Abstract

In order to describe the toxic effect of titanium nanoparticles, an analysis of germination rate and length root were carried out on alfalfa (*Medicago sativa*) and broccoli (*Brassica oleracea itálica*) seeds; the seeds were incubated during 14 days; after incubation an analysis of protein in seeds was done. The seeds were soaked in nanoparticles solutions at different concentrations e.g., 50 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹ and, 1000 mg L⁻¹. The germination rate was calculated and root length was measured. Samples were taken for each day of measurement (0, 3, 7 and 14 days) and kept at -20°C. A protein analysis was done, the analyzed samples correspond to those treated at 0 and 1000 mg L⁻¹, corresponding to 0, 3 and 7 days of incubation. It was found an effect of theses materials on morphometry and germination rate; there was an inhibition in growth and root length on plants with nanoparticles. After the protein analysis, it is assumed that existed effect of nanoparticles solution on the concentration of some proteins for the treatments analyzed.

Palabras Clave

Longitud de raíz; Porcentaje de germinación; Electroforesis, Hortalizas

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la nanotecnología y sus aplicaciones han tenido un rápido crecimiento, de manera que se han creado y comercializado nuevos productos que continuamente son introducidos al mercado global, de tal manera que, es inevitable la acumulación de éstos en el medio ambiente [1]. Tales avances en la ingeniería de materiales han permitido la producción de nanomateriales, teniendo características físicas y químicas únicas [2]. Hoy en día, las aplicaciones de nanopartículas (NPs) se han desarrollado en diferentes disciplinas: medicina, materiales, electrónica, cosméticos, etc., y se ha comenzado a ver el potencial dentro de la agricultura. Pese a los beneficios y efectos positivos de estos avances se tiene como preocupación principal el impacto negativo previsto por su entrada en ecosistemas terrestres y acuáticos pues tienen como consecuencia efectos toxicológicos en animales y plantas. [3]

Nanopartículas y plantas

Existen estudios que demuestran el impacto de diferentes tipos de NPs, entre ellas, NPs metálicas, cuando interactúan con plantas las cuales causan un cambio morfológico y fisiológico. [4]. La biodisponibilidad de NPs depende de las características del suelo, propiedades de NPs y el tipo de planta lo cual impacta directamente al crecimiento y germinación de ésta. En general, las plantas requieren de elementos metálicos esenciales (micronutrientes) para un correcto funcionamiento de enzimas y proteínas dependientes de éstos, sin embargo, algunos elementos no esenciales como As, Hg, Cd y Pb, son tóxicos para ellas [5]. Las principales fuentes de contaminación de estos metales son: fertilizantes orgánicos e inorgánicos, tratamiento de aguas, deposición atmosférica, rellenos sanitarios, transporte de automóviles, etc. [6]. Sin embargo, otros estudios demuestran los efectos benéficos de otros metales, por ejemplo, NPs de titanio en la longitud de raíz (*Arabidopsis thaliana* a 400 mgL⁻¹), germinación (*Foeniculum vulgare* a 60 mgL⁻¹) y crecimiento de planta (*Lemna minor* menor a 200 mgL⁻¹) [7][8].

Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de nanopartículas de titanio (NPs-TiO₂) sobre el proceso de germinación y crecimiento en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) y brócoli (*Brassica oleracea itálica*) durante 14 días de incubación para describir las posibles alteraciones morfológicas haciendo uso de variables como longitud de raíz y porcentaje de germinación. Un análisis proteico en los días 0, 3 y 7 fue empleado para determinar el efecto de estas NPs respecto a la concentración utilizada y días de exposición, para la obtención de la expresión de proteínas como análisis preliminar previo a un análisis de agrupamiento de bandas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nanopartículas y acondicionamiento de semillas

Se emplearon NPs de titanio (TiO₂) las cuales presentan un tamaño <50 nm. Fueron adquiridas de ID-nano, Investigación y Desarrollo de Nanomateriales S.A. de C.V.

Se seleccionaron dos tipos de plantas: alfalfa (*Medicago sativa*) y brócoli *Brassica oleracea itálica* por su importancia a nivel comercial en el estado de Guanajuato. Las semillas estuvieron almacenadas a temperatura ambiente en su sobre hermético. Antes del tratamiento, éstas fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 6% y se enjuagaron con agua destilada.

Tratamientos e incubación

Fueron establecidos cuatro tratamientos: solución control (TC) y tres soluciones con NPs, de tal manera que fueron preparadas a sus respectivas concentraciones, 50 (T1), 500 (T2) y 1000 (T3) ppm (mg L⁻¹).

Posteriormente, se dejaron inmersas en dichas soluciones durante 10 horas.

Se prepararon cajas Petri acondicionadas con papel filtro para colocar las semillas embebidas en las soluciones. Fueron utilizadas 3 cajas por tratamiento que correspondieron a los días de medición 3, 7 y 14 (el día 0 no necesitó caja, se

tomó la muestra luego de retirar las semillas de las soluciones). En cada día, se tomaron muestras de semilla y/o raíz tales que, fueron colocadas en tubos eppendorf ® etiquetados, y almacenadas a -20°C.

Electroforesis de proteínas

Se realizó el análisis empleando geles de electroforesis para las muestras guardadas en congelador correspondientes a los días 0, 3 y 7.

Se llevó a cabo la extracción de proteína empleando un buffer de solución amortiguadora (TRIS 300 mM, EDTA 25.5 mM, KCl 40 mM, Sacarosa 180 mM, ajustando a pH=8) e inhibidor de proteasa. Se colocaron volúmenes entre 400 y 500 µL de esta solución a cada muestra; se llevó a cabo lisis mecánica en la cual se utilizó pistilo para homogeneizar y posteriormente se centrifugó a 4000 xg. Empleando el equipo de UV-vis Thermo Scientific se obtuvo la concentración de proteína extraída utilizando como referencia una curva estándar de BSA (Bovine Serum Albumin) (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/ml). Una vez conocida la concentración se preparó el gel de acrilamida (gel separador al 12% y gel concentrador al 5%) para realizar la electroforesis.

Se tomaron 15 µg de proteína para cada una de las muestras, correspondiente a volúmenes diferentes y 5 µL de buffer (2x *Laemmli sample buffer* y mercaptoetanol). Tales muestras se calentaron durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron 1 minuto y fueron cargadas en los pozos del gel, dejando el primer carril para el marcador de peso molecular (5µL).

Se dejó correr por dos horas con un voltaje de 80V, al finalizar se tiñó con azul de comassie al 0.125% por 20 minutos y se destiñó por una hora con una solución 40% metanol-10% ácido acético, posterior a ello con una solución destañadora 5% metanol-7% ácido acético por dos días.

Selección de variables de respuesta

Se realizó la medición de longitud de raíz para el día 3 y 7 de incubación. Además, se cuantificó la cantidad de semillas germinadas para los días 3, 7 y 14, y se calculó el coeficiente de velocidad de germinación (Coeficiente de Kotowski).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Longitud de raíz y porcentaje de germinación

Las IMAGENES 1 y 2 presentan las gráficas obtenidas para la longitud de raíz medidas al día 3 y 7 de incubación para ambas plantas. Se puede observar que al día 3 alfalfa presentó mayor longitud, mientras que al 7, brócoli superó este resultado. Para el caso de brócoli al día 7, no hay diferencia significativa entre TC y los tres tratamientos, pero se obtuvo que para T3 hubo inhibición en la longitud de raíz, mientras que, para alfalfa, se encontró diferencia entre TC y T1 pero no con T2 y T3

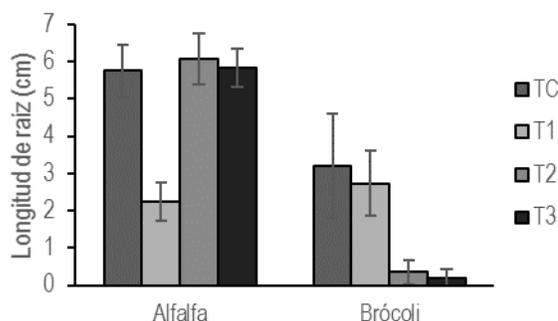


IMAGEN 1. Longitud de raíz para los cuatro tratamientos analizados al día 3 de incubación

Para el caso del porcentaje de germinación, la Tabla 1 muestra los valores obtenidos, así como para el coeficiente de velocidad de germinación. Tales valores fueron presentados para el día 14 de incubación. Se puede observar que para alfalfa se obtuvieron los resultados de mayor valor, habiendo una diferencia entre T1 y TC, mientras que, para brócoli se puede observar que el porcentaje de germinación es menor para las semillas tratadas con NPs respecto al tratamiento control. Respecto al coeficiente de Kotowski, alfalfa obtuvo el mismo valor para los 4 tratamientos, teniendo un crecimiento rápido y constante, mientras que brócoli en dos de sus tratamientos obtuvo el mismo valor que la otra semilla, sin embargo, sus porcentajes son menor respecto a ésta.

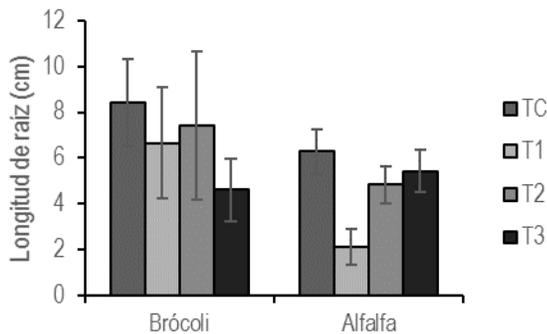


IMAGEN 2. Longitud de raíz para los cuatro tratamientos analizados al día 7 de incubación

Tabla 1: Porcentaje y coeficiente de velocidad de germinación para el día 14 de incubación.

Semilla	Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación al día 14	Coficiente de Kotowski al día 14
Alfalfa	TC	93	12.5
	T1	97	12.5
	T2	90	12.5
	T3	88	12.5
Brócoli	TC	92	12.1
	T1	33	12.2
	T2	71	12.5
	T3	71	12.5

Algunos autores mencionan que los índices de germinación y elongación de plántulas son los principales puntos de comparación más utilizados entre plantas y nanopartículas lo cual depende directamente del tipo de nanopartícula y la especie de planta [9]. Un estudio realizado con NPs de titanio en trigo mostró que no había cambios en la velocidad de germinación, sin embargo, se encontraron efectos en la semilla [10]; para jitomate desde 10 a 1000 mgL⁻¹ se inhibe significativamente la germinación.

Perfil proteico: análisis preliminar

El análisis del efecto de nanopartículas sobre el perfil de proteínas requiere el estudio de la concentración de cada banda en el gel para un

análisis de agrupamiento y definir el efecto de NPs sobre las proteínas, lo cual, en este caso, lleva a mostrar solamente un análisis preliminar

De acuerdo a los perfiles de proteínas obtenidos a partir del análisis de electroforesis, resultó que, respecto a cada tratamiento, hay una disminución en la intensidad de las bandas, tanto para alfalfa (IMAGEN 3) como para brócoli (IMAGEN 4).

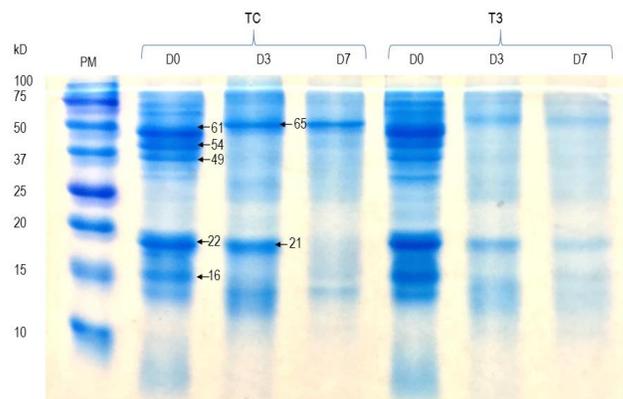


IMAGEN 3. Perfil de proteínas para alfalfa (*Medicago sativa*) a los días 0, 3 y 7 (D0, D3, D7) para TC y T3.

Por otro lado, se observa un patrón de bandas entre los días medidos. Es decir, para el día 0 (D0) en ambos tratamientos se muestran las mismas bandas de proteínas, lo mismo ocurre para D3 y D7 en ambas plantas.

Con estos resultados, podría decirse que, con el paso del tiempo y cuando existe la presencia de NPs, la concentración de proteína disminuye (preliminarmente), comparando T3 con TC. Además, para ambas semillas, como se observa en las IMÁGENES 3 y 4, para el día 7, el T3 fue la banda que se observó de manera degradada y con menor definición.

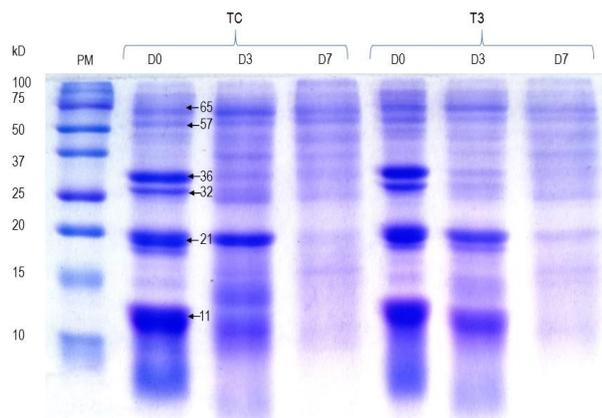


IMAGEN 4. Perfil de proteínas para alfalfa (*Brassica oleracea italica*) a los días 0, 3 y 7 (D0, D3, D7) para TC y T3.

Algunos autores han realizado estudios para monitorear la concentración de proteína con NPs de plata a 10 mgL^{-1} en *Bacopa monnieri* entre los días 5 y 30 y encontraron un decremento al día 10 comparado con el día 5 [11]. Otro estudio mostró que, al someter trigo con NPs de aluminio incrementaban las proteínas [12].

CONCLUSIONES

Se encontró que existe un efecto de las NPs de titanio sobre el crecimiento y germinación de plántulas de brócoli y alfalfa como en el perfil proteico. En el primer caso, hay una diferencia significativa entre los tratamientos con NPs y el control respecto a la longitud de raíz para los días de crecimiento y se observó una inhibición en la germinación de semillas. De acuerdo con el perfil de proteínas, también se encontró que con NPs, las bandas en el gel disminuían en intensidad y presumiblemente, la concentración. Todo esto da pauta para realizar estudios a largo plazo y así evaluar las implicaciones que tienen no solo el titanio, sino otros metales pesados sobre la respuesta de plantas y los efectos toxicológicos que pueden presentar en el medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Jessica Denisse Valle García y Edgar Vázquez Núñez agradecen el apoyo económico otorgado

por el proyecto Prodep para el Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC UGTO-PTC-571, a la beca por el proyecto de Veranos UG 2017 y a la Dra. Laura Edith Castellano Torres por su apoyo en la parte experimental para el perfil de proteínas.

REFERENCIAS

- [1] Rossi, L., Zhang, W. & Ma, Xingmao. (2017) Cerium oxide nanoparticles alter the salt stress tolerance of *Brassica napus L.* by modifying the formation of root apoplastic barriers. *Environ. Pollut.* 229, 132-138.
- [2] B. Nowack, t. D. Bucheli, (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ, Pollut.* 150, 5-22.
- [3] G. Oberdörster, J. Oberdörster, (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ, Health Perspect.* 113, 823-839.
- [4] Siddiqui, M., Al-Wahaibi, M., Firoz, M., Al-Khaishany, Y. (2015) Role of nanoparticles in plants. Siddiqui, Manzer H, Al-Wahaibi, Mohamed H, Mohammad, Firzo. *Nanotechnology and plant sciences* (pp- 19-21).
- [5] Mustafa, G, Komatsu, S (2016) Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1864, 932-944.
- [6] Arif, N., Yadav, V., Singh, S., Singh, Sw., Ahmad, P., Mishra, R., Sharma, S., Kumar, D., Dubey, N. & Chauhan, D. (2016). Influence of high and low levels of plant-beneficial heavy metal ions on plant growth and development. *Frontiers in environmental science.* 4:69.
- [7] Lee, CW., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, YC., Braam, J., Alvarez, PJJ. (2010) Development phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem* 29: 669-675.
- [8] Feizi, H., Kamali, M., Jafari, L., Rezvani, M. (2013) Phytotoxicity and stimulatory impacts of nanosized and bulk titanium dioxide on fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Chemosphere* 91(4): 506-511.
- [9] Du, W., Tan, W., Peralta-Videa, J. Gardea-Torresday, J., Ji, R., Yin, Y., & Guo, H. (2017) Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: physiological and biochemical aspects. *Plant physiology and biochemistry.* 110, 210-225.
- [10] Feizi, H., Amirmoradi, S.H., Abdollahi, F., Jahedi, S.P., (2013). Comparative effects of nanosized and bulk titanium dioxide concentrations on medicinal plant *salvia officinalis L.* *Annu. Re. Res. Bio* 3 (4), 814-829.
- [11] Krishnaraj, C., Jagan, E., Ramachandran, R., Abirami, S., Mohan, N. (2012) Effects of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn) Wettst. *Plant Growth Metab. Proc. Biochem.* 47, 651-658.
- [12] Oh, M., Roy, S., Kamal, A., Cho, K., Co, S., Park, C., Choi, J., Komatsu, S., Woo, S. (2014) Proteome analysis of roots of wheat seedlings under Al stress, *Mol. Biol. Rep* 41 671-681.