

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS FITOTÓXICOS DE PARTICULAS FINAS DE ÓXIDO DE COBRE (II) EN LENTEJAS

María Fernanda Ramírez León¹, Cynthia Denisse Caudillo Yebra², Gustavo Cruz Jiménez³

^{1,2} Licenciatura en Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

³ Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

cruzg@ugto.mx³

mf.ramirezleon@ugto.mx¹

cd.caudilloyebra@ugto.mx²

Resumen

Debido a la falta de información sobre el campo de la nanotoxicología, el objetivo de esta investigación es brindar nuevos datos para evaluar los riesgos de exposición al entorno de partículas finas de Cu (II) de 150 nm, muy cercano al tamaño que presentan las nanopartículas (NPs), y de Cu (II) usando acetato de cobre (II) monohidratado a granel. En este estudio se evaluaron los efectos fitotóxicos en semillas y plántulas de lentejas (*Lens culinaris*), cultivo leguminoso relevante en el estado de Guanajuato por ser el segundo productor a nivel nacional y por su alta demanda provocada por su elevado contenido de proteínas. Para evaluar los efectos fitotóxicos, se estudiaron su porcentaje de germinación y elongación radicular. Los resultados de germinación de semillas indicaron que el Cu en la concentración más baja promueve la germinación de semillas y el crecimiento de la radícula tanto en su forma de Cu (II) a granel como en su forma de partícula fina de 150 nm. Sin embargo, a concentraciones más altas, mostraron una reducción significativa en los parámetros de crecimiento y germinación en soluciones de Cu (II) como acetato.

Palabras clave: Lenteja; Germinación; Cobre; Nanopartícula; Fitotoxicidad.

Introducción

Las nanopartículas (NPs) son agregados atómicos o moleculares con una dimensión entre 1 - 100 nm (Roco, 2003), se pueden modificar drásticamente en sus propiedades fisicoquímicas en comparación con el material a granel (Nel, 2006). Sin embargo, en sus extensos usos existe una liberación durante su producción, aplicación y eliminación de forma involuntaria en el medio ambiente.

Se ha investigado la huella fitotóxica de varias NPs en distintas especies de plantas, ya que el identificar los efectos fitotóxicos nos permite determinar factores de riesgo y tolerancia derivados de una exposición de la planta analizada.

Las pruebas de fitotoxicidad se orientan en el porcentaje de germinación, el tamaño de la radícula e incluso en casos extremos, la mortalidad de la planta. Teniendo en cuenta que la semilla sufre una inhibición y esto provocaría entre otros casos, mitosis tardía o alteraciones en el crecimiento radicular (Fernández et al., 2006).

En el caso particular, las nanopartículas de cobre (Cu NPs) tienen diferentes aplicaciones desde la industria de la microelectrónica por su propiedad conductora, hasta la industria textil por su efecto antimicrobiano (Ravishankar y Jamuna, 2011). Sin embargo, se tiene que poner en análisis exhaustivo los posibles impactos negativos en suelos, cuerpos de agua e incluso para los seres vivos.

Debido a la falta de información sobre el campo de la nanotoxicología, el objetivo de esta investigación es brindar nuevos datos para evaluar los riesgos de exposición al entorno de Cu NPs. Puntualmente los efectos fitotóxicos en plantas de lentejas (*Lens culinaris*), cultivo leguminoso relevante en el estado de Guanajuato por ser el segundo productor a nivel nacional (Axayacatl, 2022) y por su alta demanda provocada por su elevado contenido de proteínas y su bajo costo.

Materiales y métodos

Semillas de lentejas

Las semillas de lentejas (*L. culinaris*) se adquirieron en un establecimiento comercial de la marca La Merced. Posteriormente, las semillas se sometieron a un tratamiento pregerminativo que nos ayuda a escarificar y esterilizar, para ello se utilizó una solución de NaOCl al 8% durante mínimo 30 minutos antes de ser sembradas en las cajas petri, manteniendo una agitación constante (Ver Figura 1).



Figura 1. Imagen tomada durante el conteo de semillas de lenteja de venta comercial y en la parte derecha se observa cómo se realiza el tratamiento pregerminativo.

Germinación de semillas y elongación de radícula

Se realizó el procedimiento de acuerdo con US EPA (1996) que nos indica a partir de la germinación de las semillas (SG) y el alargamiento de la radícula (RE) la toxicidad que puede haber en las plantas a partir de las fracciones contaminantes que se encuentran en el agua (Bagur et al, 2010).

Para el tratamiento 0 (control blanco) se hizo un cuadruplicado de 15 semillas, anteriormente sometidas al tratamiento pregerminativo, colocando cajas petri con papel filtro en la parte inferior y superior preservando en todo momento la esterilidad de los materiales. Posteriormente se humidificaron con agua desionizada (6mL), para introducir las en la cámara ambiental (BIOTRONETTE MARK III) por un periodo de 120 horas. Posterior fueron retiradas, y se midieron las radículas de las semillas germinadas.

Los tratamientos realizados se resumen en la Tabla 1. Como se puede observar, para el Tratamiento 1, las semillas se trataron con cinco soluciones con diferentes concentraciones (0, 1, 10, 100, 1000 ppm) de Cu (II) utilizando como base la sal de acetato de cobre (II) monohidratada. Además, se les adicionó solución nutritiva de Hoagland ajustando a un pH = 5.0, por cuadruplicado de 15 semillas y al igual que en el Tratamiento 0 se dejaron germinar sobre el papel filtro en cajas petri. Adicionando 8mL de las soluciones preparadas, se dejaron a oscuridad durante 120 horas en la cámara ambiental. Después se realizó el conteo para determinar el porcentaje de germinación de las semillas, y se midieron nuevamente las radículas de las semillas que lograron su germinación.

En el Tratamiento 2, se adquirieron partículas finas de Cu (II) en la forma de CuO con un tamaño de partícula promedio de 150 nm. Las nanopartículas fueron proporcionadas por el Dr. Juan Luis Pichardo Molina del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO) de León, Guanajuato. Se prepararon tres soluciones con concentraciones distintas de Cu NPs (0, 1, 10 ppm) y solución nutritiva de Hoagland. Se realizó por triplicado y se dejaron germinar en las mismas condiciones que los tratamientos anteriores, para poder medir la elongación de su radícula en caso de tener germinación.

A partir de los datos obtenidos se midieron los índices de toxicidad de acuerdo con los siguientes cálculos:

-SG, que es calculado con la Eq. 1: En términos estadísticos, representa el porcentaje residual normalizado de semillas germinadas después del experimento.

$$SG = (Germ_{muestra(i)} - Germ_{control}) / Germ_{Control} \quad (1)$$

Donde $Germ_{muestra(i)}$ es el número de semillas germinadas en la solución saturada i (%), y $Germ_{control}$ es el número de semillas germinadas en el control blanco (%)

-RE, es calculado con la Eq 2: En términos estadísticos, esto representa el alargamiento residual normalizado de la raíz de las semillas germinadas por tratamiento.

$$RE = (Elong_{muestra(i)} - Elong_{control}) / Elong_{control} \quad (2)$$

Donde $Elong_{muestra(i)}$ es la longitud media de las raíces de las semillas en el extracto de saturación i (cm), y $Elong_{control}$ es la longitud de las raíces de semillas en el blanco control (cm) . Para mayor referencia de la manera en cómo se midieron las raíces, revisar la Figura 2.

De acuerdo con la investigación de Bagur se estableció los valores de toxicidad que se encuentra en las plantas a largo tiempo. La escala es la siguiente: (a) 0 a -0.25 baja toxicidad, (b) -0.25 a -0.5 moderada, (c) -0.5 a -0.75 alta y (d) -0,75 a -1 muy alto. RE valores > 0 indicaría la estimulación del crecimiento de la semilla (hormesis) (Bagur et al, 2010).

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el diseño experimental y promedios obtenidos para porcentaje de germinación y elongación de radículas.

Tratamiento	[ppm]	% Germinación	Promedio de Elongación de radícula
0	Control Blanco	67.00%	46.5
1	0 ppm Cu	58.33%	40.8
	1 ppm Cu	60%	50.9
	10 ppm Cu	40%	39.6
	100 ppm Cu	11.67%	9.5
	1000 ppm Cu	0%	0.0
2	0 ppm Cu NPs	22.22%	24.5
	1 ppm Cu NPs	15.56%	27.4
	10 ppm Cu NPs	33.33%	25.6

El tratamiento 0 y 1 se realizaron 4 réplicas y 3 réplicas para el tratamiento con las partículas finas de CuO de 150 nm, se sembraron 15 semillas de lentejas. Los tratamientos se situaron en cajas petri esterilizadas. Y fueron colocadas en una cámara ambiental durante 4 días y con una frecuencia de riego dependiendo de la reducción de peso, teniendo como referencia el peso inicial (< al 10% indicaba la necesidad de riego) y se realizaba con agua desionizada en una zona estéril. La medición de la elongación de radícula se realizaba al concluir los 4 días de germinación con apoyo de un pie de rey digital en mm.

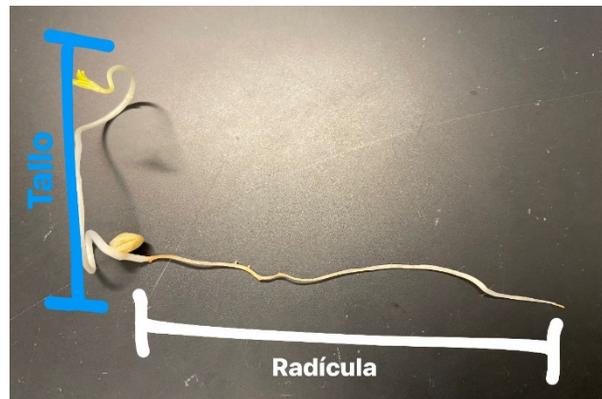


Figura 2. Imagen para una correcta identificación de las partes que conforman el proceso germinativo de las semillas de lentejas.

Análisis Estadístico

Se manejó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), para comprobar la hipótesis nula de igualdad entre los tratamientos usando el software Minitab, al igual que para el método Tukey de pruebas simultáneas para corroborar diferencias entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza individual del 99.25%. El software GraphPad Prism 9 para realizar los distintos gráficos que nos ayudaran a interpretar los resultados.

Resultados y discusión

Germinación de semillas (SG) y elongación de radícula (RE) de lentejas

La germinación de semillas de lenteja resultó en las diferentes diluciones muy tóxicas (índice de toxicidad -1.00 a -0.73) de acuerdo con el índice de Bagur (2010). En la elongación de radícula se observó una alta toxicidad (de -1.00 a -0.76). No se observaron diferencias significativas entre las diferentes diluciones estudiadas tanto en SG y RE ($p < 0.05$).

Evaluación fitotóxica del crecimiento de lentejas

Las semillas de lentejas cuando fueron sometidas al tratamiento 1 con solución de Cu, solamente germinaron en concentraciones de 1ppm y 10ppm. El porcentaje de germinación fue de 60% - 40%, con una elongación de radícula promedio de 50mm - 40mm. Mientras que en las soluciones de 100ppm y 1000 ppm de Cu se observó una drástica disminución del porcentaje germinativo 11.6% - 0%, con promedio de elongación radicular de 9.5mm.

Los resultados de germinación de lentejas se muestran en la Figura 3. Se observa que conforme aumenta la concentración de ppm de Cu en las soluciones disminuye la germinación de las semillas y existe una disminución significativa de la germinación hasta 100 ppm de Cu (II) en su forma de acetato ($p < 0.05$), llegando a ser nula esta germinación a las 1000 ppm de Cu (II).

En el tratamiento 2 con solución de partículas finas de cobre de CuO, para las concentraciones de 1 ppm y 10 ppm, no se encontró un efecto significativo, interpretándolo como una absorción incompleta debido al estado suspendido en el que se encontraban las nanopartículas. El porcentaje de germinación es de 15% - 33.3% presentando una elongación promedio de 26mm de radícula.

En la Figura 4 se muestra el porcentaje de germinación, observando que no hay un efecto relevante en estas concentraciones de las partículas finas de CuO, siendo estadísticamente iguales al control a concentraciones de 1 y 10 ppm de Cu (II) como CuO ($p > 0.05$). Aunque se observa un ligero incremento promedio del porcentaje de germinación en 10 ppm, como se mencionó, no es significativo.

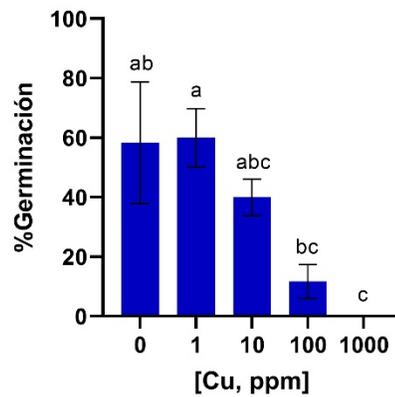


Figura 3. Fitotoxicidad en el porcentaje de germinación de lenteja en presencia de Cu (II) como sal de acetato. La altura de las barras representan el promedio de germinación en los diferentes tratamientos, las barras de error representan el error estándar (n=4). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

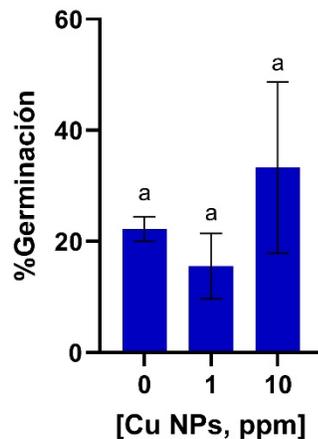


Figura 4. Fitotoxicidad en el porcentaje de germinación de lenteja de partículas finas de Cu (II) usando CuO como fuente de Cu. La altura de las barras representan el promedio de germinación en los diferentes tratamientos, las barras de error representan el error estándar (n=3). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Otros autores (Lin y Xing, 2007) estudiaron los efectos de las nanopartículas de Zn y ZnO en las pruebas de germinación de semillas y alargamiento de la raíz. Aquí los resultados indicaron que las nanopartículas de Zn y ZnO causaron una inhibición significativa de la germinación de semillas y el crecimiento de la raíz. Siendo esto muy congruente con lo obtenido con las partículas finas de Cu, muy cercanas al tamaño de nanopartícula. En este caso, se debe considerar que tanto el Zn (II) como el Cu (II) se pueden considerar son micronutrientes de las plantas y pueden tener comportamientos similares.

En bioensayos de chile, tomate y pepino (Torres et al. 2016) observaron que la aplicación de nanopartículas de cobre a dosis bajas, promueve el vigor de germinación y el desarrollo del tallo y/o radícula. Sin embargo, se están realizando nuevos estudios para corroborar esta información.

Conclusiones

La investigación actual destacó que el efecto de fitotoxicidad en el porcentaje de germinación de la lenteja de las partículas finas de Cu (II) fue proporcional a la concentración de los tratamientos donde el Cu (II) se administraba en forma de acetato de cobre (II) monohidratado. En el caso de las partículas finas (150 nm) de cobre (II) al ser suministradas como CuO no se observa un efecto fitotóxico negativo en las concentraciones de 1 y 10 ppm de Cu (II), lo que indica que no existen efectos fitotóxicos evidentes. Se proponen futuros experimentos en donde se aumente la concentración de las partículas finas de CuO en lenteja para ver si existe un comportamiento similar al que presenta el acetato de cobre. Esto podría ayudar para ver si pueden ser más tóxicas las partículas finas de Cu (II) que el acetato de cobre (II) monohidratado a granel, con mayor tamaño de partícula. También se propone comparar este tamaño de nanopartículas finas (de 150 nm), con nanopartículas de CuO de menor tamaño para ver si tienen comportamiento de nanopartículas.

Agradecimientos

Se agradece a la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por la beca otorgada para realizar la estancia del Verano de Investigación. Al laboratorio de Evaluación Toxicológica y Riesgo Ambientales (LETRA) y a la Q.F.B. Claudia Karina Sánchez Sánchez por su apoyo en éste laboratorio. Al CONACyT por el apoyo recibido del proyecto de Infraestructura 2015 (convenio No. 255270). Además se agradece la ayuda otorgada por la Dra. Liss Lérica Flores Villavicencio del Departamento de Biología y al Dr. Juan Luis Pichardo Molina del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO) de León, Guanajuato, por proporcionar las partículas finas de CuO para este estudio.

Referencias

- Axayacatl. O. (2022). Estados productores de lenteja en México. Blog Agricultura. Recuperado de: <https://blogagricultura.com/estados-produccion-lenteja/#:~:text=En%202020%20el%20estado%20de,100%25%20de%20la%20producci%C3%B3n%20nacional>
- Bagur González, M. G., Estepa Molina, C. Martín Peinado, F. & Morales Ruano S. (2010) Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. Bioassay of the metal (loid)s As,Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *J Soils Sediments*. 11(2):281-289. doi: 10.1007/s11368-010-0285-4.
- Esteban. D., Jiménez. B., Ramírez., Gómez. B., Mejía., Teniente. L., Veloz. R. & Díaz. C. (2020) Crecimiento y desarrollo de lenteja (*Lens culinaris*) mediante la aplicación de diversos fertilizantes de origen químico y biológico. Universidad de Guanajuato. Recuperado de: http://congresos.cio.mx/17_enc_mujer/cd_congreso/archivos/resumenes/S4/S4-BCA20.pdf
- Fernández, L. C., Rojas, N. G., Roldan, T. G., Ramírez, M. E., Zegarra, H. G., Uribe, H., Reyes, R. J., Flores, D. and Arce, J. M. (2006) Manual de técnicas de análisis de suelo aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto mexicano del petróleo, México.
- Khan, Z., Shahwar, D., Ansari, M. K. Y., & Chandel, R. (2019). Toxicity assessment of anatase (TiO₂) nanoparticles: A pilot study on stress response alterations and DNA damage studies in *Lens culinaris* Medik. *Heliyon*, 5(7), e02069.
- Lin, D., & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243-250.
- López, J. A. O., Hernández, M. F., Ortiz, H. O., Preciado, P., & Rangel, H. Z. G. APLICACIÓN FOLIAR DE NANOPARTICULAS DE COBRE (NPsCu) Y SU EFECTO EN EL RENDIMIENTO DE MELÓN HIDROPONICO. In IV Congreso Internacional y XV Congreso Nacional sobre Recursos Bióticos de Zonas Áridas (p. 212). Recuperado de: https://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefndmkaj/https://congresorebiza.mx/wp-content/uploads/2019/11/REBIZA_2019.pdf

- Nations, S., Long, M., Wages, M., Maul, J. D., Theodorakis, C. W., and Cobb, G. P. (2015). Subchronic and chronic developmental effects of copper oxide (CuO) nanoparticles on *Xenopus laevis*. *Chemosphere* 135(Suppl. C), 166–174. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.078
- Nel, T., L. Madler, and N. Li. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622 – 627.
- Ravishankar Rai, V., and Jamuna Bai, A. (2011). *Nanoparticles and Their Potential Application as Antimicrobials*, ed. A Méndez-Vilas A. Mysore: Formatex.
- Roco, M. C. (2003). Broader societal issue of nanotechnology”. *Journal of Nanoparticle Research*. 5: 181 – 189.
- Sharma, P., Gautam, A., Kumar, V., & Guleria, P. (2022). MgO nanoparticles mediated seed priming inhibits the growth of lentil (*Lens culinaris*). *Vegetos*, 1-14.
- TORRES, N. A. R., LOPEZ, J. I. G., RICARDO, H. L. S., REYES, I. V., & ARGUELLO, B. M. (2016). Efecto de nanopartículas metálicas y derivadas del carbón en la fisiología de semillas