

Evaluation of the phytotoxicity of metallic copper and copper oxide II nanoparticles in the germination of *Zea mays* (maize)

Evaluación de la fitotoxicidad de nanopartículas de cobre metálico y óxido de cobre II en la germinación de semillas de *Zea mays* (maíz)

Mauricio Alejandro Garcia Castillo¹, Mónica Aracely Cuéllar Hidalgo², María Avelina Bedolla Medina¹, Ángela Celeste Landeros Morales¹, Cynthia Landín Miranda¹, Francisco Sauza², Gustavo Cruz Jimenez³

¹Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

²Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

³Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
ma.garciacastillo@ugto.mx, ma.cuellar.hidalgo@ugto.mx, ma.bedollamedina@ugto.mx, ac.landerosmorales@ugto.mx,
c.landinmiranda@ugto.mx, f.sauza@ugto.mx, cruzq@ugto.mx

Resumen

Las nanopartículas (NP's) del Cu y sus derivados han demostrado tener una amplia aplicación en la industria principalmente por su actividad antimicrobiana, razón por la cual es común encontrarlas presentes en los materiales producidos por las grandes industrias. La abundante presencia de estas NP's que eventualmente son liberadas al ambiente, formula nuevas cuestiones acerca de los efectos que podrían causar al interactuar con organismos que las pueden absorber fácilmente, como las plantas. En el presente estudio, se muestran los resultados de experimentos realizados con NP's de Cu metálico y CuO en concentraciones de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm para evaluar la fitotoxicidad que ejercen estas partículas sobre el maíz (*Zea mays*), una planta fundamental en la dieta de los mexicanos. Los resultados demostraron que existe una tendencia de disminución en la longitud de raíz e hipocótilo conforme aumenta la concentración de la NP's de Cu y CuO, sin embargo, este decremento en el desarrollo de la plántula no fue significativo con respecto al control ($p > 0.05$). Con respecto a la germinación, se observó un aumento en el porcentaje de germinación de las semillas de maíz conforme aumento la concentración de NP's, el cual no es significativo al compararse con el control ($p > 0.05$). Estos resultados indican que las plántulas de maíz fueron tolerantes a las NP's de Cu y CuO en concentraciones de hasta 1000 ppm.

Palabras clave: nanopartículas, Cu, CuO, fitotoxicidad, maíz

Introducción

Las nanopartículas (NP's) son objetos tridimensionales que tienen un diámetro en un intervalo que va de 1 a 100 nanómetros (Esparza P., et al. 2014) y cuyo tamaño nanométrico posee relevantes aplicaciones en la actualidad. Las NP's a base de cobre (CuO y Cu) son parte de las NP's metálicas más utilizadas, debido a su capacidad de inhibición del crecimiento de microorganismos, por lo que se encuentran presentes en la industria textil, cosmética, farmacéutica, plástica y de envases alimenticios, aunque adicionalmente poseen propiedades ópticas, eléctricas y catalíticas potencialmente aplicadas a la electrónica, mientras que el CuO específicamente tiene un uso como absorbente en la purificación de agua (Andreotti F. et al., 2015).

El cobre al ser un micronutriente para las plantas ejerce un protagonismo en su metabolismo al encontrarse presente en las enzimas encargadas de procesos fisiológicos tan importantes como la fotosíntesis, respiración, desintoxicación de radicales superóxidos y lignificación (Kirkby & Romel, 2007). Además, estudios han demostrado que las NP's de Cu y sus derivados tienen potencial de aplicación en el sector agrícola principalmente para control de hongos y bacterias fitopatógenos al ser adicionados en concentraciones específicas a agroquímicos (Nizolaza Pariona et al., 2018).

La presencia de nanopartículas en la germinación de la semilla puede conducir a la adsorción y absorción de las NP's por las raíces y a su translocación, transportando las NP's a través de una vía apoplástica o simplástica. Las nanopartículas pueden sufrir diferentes reacciones por el proceso de biotransformación, sin

embargo, la ocurrencia de las reacciones depende de las características metálicas, las interacciones a escala nanométrica, el modo de exposición y la planta en estudio (Peng C et al., 2015).

Debido a la inevitable liberación de nanopartículas metálicas en el medio ambiente durante el proceso de producción, uso y eliminación de productos relacionados con las NP's metálicas, surge la necesidad de comprender el efecto fitotóxico e interacción con plantas de interés comercial debido a la bioacumulación y biomagnificación de las nanopartículas metálicas porque estudios demuestran que su presencia en alimentos de animales o seres humanos puede tener potenciales riesgos la salud humana por la toxicidad de las NP's metálicas. (Peng C et al., 2015).

Según datos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2021 en México, el consumo de maíz anual *per cápita* fue de 346.4 kilogramos, siendo este el cereal más consumido en el país. Estas cifras demuestran el papel fundamental que desenvuelven los cultivos de maíz en la dieta de los mexicanos, y por ende, su importancia económica.

El maíz (*Zea mays*) es una planta originaria de Mesoamérica, perteneciente a la familia de las poaceae, que germina bajo condiciones favorables de humedad y temperatura que promueven la aceleración en la división y elongación celular hasta emerger el embrión presentando la radícula e hipocótilo en la plántula (Escobar J.L.A. et al., 2021). El maíz es clasificado como una planta monocotiledónea, ya que posee solamente una hoja embrionaria, y lleva a cabo el proceso de germinación hipógea, en la cual el cotiledón permanece debajo de la tierra, como se observa en la Figura 1.

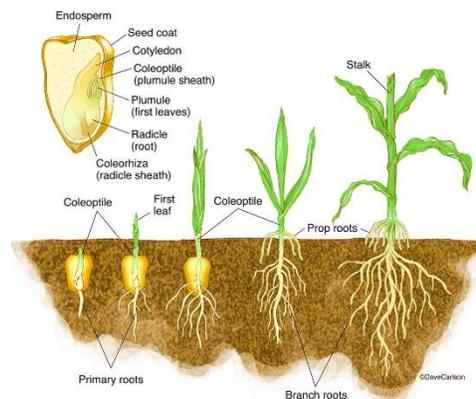


Figura 1. Germinación de *Zea mays* (maíz). Lleva a cabo un proceso de germinación hipógea. (Carlson, 2019)

La germinación ocurre tras la imbibición, un período durante el cual la semilla absorbe agua para obtener potencial hídrico, y después de unas horas, la radícula de la semilla atraviesa la testa, para dar lugar a la activación del meristemo apical de la raíz que produce el crecimiento de la raíz mediante división celular y elongación del tejido (Nabors, 2005). Es a partir de esta estructura, la raíz, donde surgen los pelos radicales, células epidérmicas especializadas que llevan a cabo la mayor parte de la absorción de agua y minerales, además de otras partículas como las NP's de Cu y CuO.

En el presente artículo, se reportan los resultados obtenidos tras someter semillas de *Zea mays* (maíz) a tratamientos con NP's de Cu y CuO a diferentes concentraciones, con el objetivo de evaluar los posibles efectos fitotóxicos que estas nanopartículas ejercen sobre esta planta de interés comercial durante su germinación y crecimiento.

Materiales y métodos

Prueba de germinación

La esterilización de las semillas de maíz se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 8%, manteniendo en agitación durante 30 min con agitador magnético en una parilla magnética. La siembra de las semillas se realizó en condiciones de esterilidad colocando en una caja de Petri un papel filtro y sobre

éste se distribuyeron 10 semillas. Se adicionan 3 mL de agua desionizada estéril, después se cubrió con otro papel filtro y se humedeció con otros 3 mL, se cerró y se pesó en una balanza digital, para controlar el volumen manteniendo un $\pm 5\%$ del peso total de la caja de Petri durante los siete días que permanecieron en la cámara ambiental en oscuridad total y temperatura ambiente.

Preparación de suspensión patrón de NP's de Cu y CuO

La suspensión patrón se obtuvo al pesar 1,000 mg de NP's de Cu en balanza analítica, se colocaron en un matraz aforado y se aforó a 100 mL con agua desionizada, obteniendo así una suspensión con una concentración de 10,000 ppm de nanopartículas de cobre, se cubrió con papel aluminio y se mantuvo en refrigeración (4°C). El procedimiento se repitió con las nanopartículas de óxido de cobre considerando su peso molecular al realizar los cálculos para obtener la suspensión patrón de 10,000 ppm de Cu.

Preparación de solución nutritiva de Hoagland

Se añadió 1.0 mL de cada una de las siguientes soluciones: 3.57×10^{-4} M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2.14×10^{-3} M CaCl_2 , 2.55×10^{-4} M KNO_3 , 2.31×10^{-5} M H_3BO_3 , 4.0×10^{-6} M MnCl_2 , 6.95×10^{-8} M MoO_3 , 3.7×10^{-7} M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, 1.0×10^{-5} M FeCl_3 , 9.68×10^{-4} M KH_2PO_4 y 9.0×10^{-4} M MgCl_2 a un vaso de precipitado de 100 mL.

Germinación de semillas con exposición a nanopartículas de cobre y nanopartículas de óxido de cobre

La suspensión patrón de 10,000 ppm NP's Cu se colocó en ultrasonido durante 5 min, transcurrido este tiempo se adicionaron 10 mL a la solución nutritiva de Hoagland, y con agua destilada estéril se completó un volumen de 80 ml para medir el pH, el cual se reguló agregando NaOH y/o HCl hasta obtener un pH de 5,80. Posteriormente se trasladó la solución a un matraz aforado de 100 mL para aforar con agua desionizada y obtener una suspensión de NP's Cu 1,000 ppm a pH 5,80. El procedimiento se repitió de manera seriada para finalmente terminar con 4 suspensiones de NP's de Cu en solución nutritiva con concentraciones de 1,000, 100, 10, 1 ppm y se realizó un blanco únicamente con solución nutritiva (0 ppm), se trasvasó cada solución un matraz Erlenmeyer distinto y se sometieron a esterilización en autoclave a 15 lb/in² durante 20 min.

La esterilización de las semillas de maíz se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 8%, manteniendo en agitación constante durante 30 minutos. La siembra de las semillas se realizó en ambiente estéril y en una caja de Petri con un papel filtro como base para colocar 15 semillas estériles. Posteriormente se adicionaron 15 mL de la suspensión de NP's Cu en solución nutritiva correspondiente con una micropipeta de 5000 μL , realizando 5 repeticiones para cada concentración. Cada caja de Petri estéril se pesó y rotuló con la concentración de NP's de Cu. Además, se pesaron las cajas de Petri con las semillas con la intención de mantener un peso mínimo, manteniendo un margen de 3 g menor al peso total con la idea de controlar el volumen durante los siete días que permanecieron en la cámara ambiental. Las cajas se mantuvieron en oscuridad total a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió con la suspensión patrón de nanopartículas de óxido de cobre.

Medición de raíz e hipocótilo

Completados los siete días en la cámara ambiental, se midió la raíz y el hipocótilo, obtenido en cada una de las semillas de maíz que germinaron haciendo uso del Vernier digital (Steren), además, se obtuvo el porcentaje de germinación de cada una de las cajas de Petri. Todos los datos obtenidos fueron registrados en el software Microsoft Excel y se utilizaron para su posterior análisis estadístico reportado en sección de resultados.

Resultados y discusión

Prueba de germinación

La germinación de las semillas de maíz en ambiente estéril, húmedo y temperatura ambiente en la cámara ambiental "BIOTRONETTE MARK III" LAB-LINE a oscuridad durante siete días resultó en un promedio de germinación del 80% de las semillas sometidas a la prueba de germinación, demostrando así la viabilidad de

las semillas de maíz a utilizar, por lo que se procedió a realizar el estudio con el tratamiento de nanopartículas de cobre (Cu) y óxido de cobre (CuO).

Germinación de semillas de maíz con exposición a nanopartículas de cobre

Las nanopartículas de cobre utilizadas fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (40 - 60 nm). Los tres parámetros medidos para evaluar el efecto fitotóxico de las nanopartículas fueron la longitud de la raíz, la longitud del hipocótilo y el porcentaje de germinación. Los resultados obtenidos en una muestra representativa de cada una de las concentraciones de NP's de Cu a las que se expusieron las semillas se muestran en la Figura 2A, en la cual se observa que conforme fue incrementando la concentración de NP's Cu fue disminuyendo la tasa de germinación, además de que se observan longitudes de raíces e hipocótilos más cortas.

El análisis estadístico se llevó a cabo en *Minitab Statistical Software v.21.4.1* y *GraphPad Prism 10*, y se realizó ANOVA de un solo factor con una confianza del 95%, utilizando la prueba *post-hoc* de Tukey HSD. En el parámetro de longitud de raíz se obtuvieron medias significativamente distintas para 1 y 1000 ppm, como se visualiza en la gráfica de la Figura 3, y de manera general se observa que el aumento en la concentración de NP's de Cu disminuye la media de la longitud de la raíz. La longitud del hipocótilo no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), pero se observa en la Figura 2 que las medias a partir de 1 ppm comenzaron a disminuir. La raíz es la estructura que primero entra en contacto y absorbe las NP's de Cu, por lo cual suele verse más afectada que el resto de la plántula. Las plántulas que germinaron bajo la presencia de la solución con NP's de Cu a 1 ppm presentaron las medias más altas, debido a que, en bajas concentraciones, el cobre actúa como micronutriente favoreciendo el crecimiento de éstas. El porcentaje de germinación de las semillas no presentó diferencias significativas en las diferentes concentraciones evaluadas de NP's de Cu (Figura 4). Por lo tanto, por lo analizado anteriormente, se puede deducir que no existe efecto de las concentraciones de NP's de Cu en el crecimiento de la plántula de maíz.

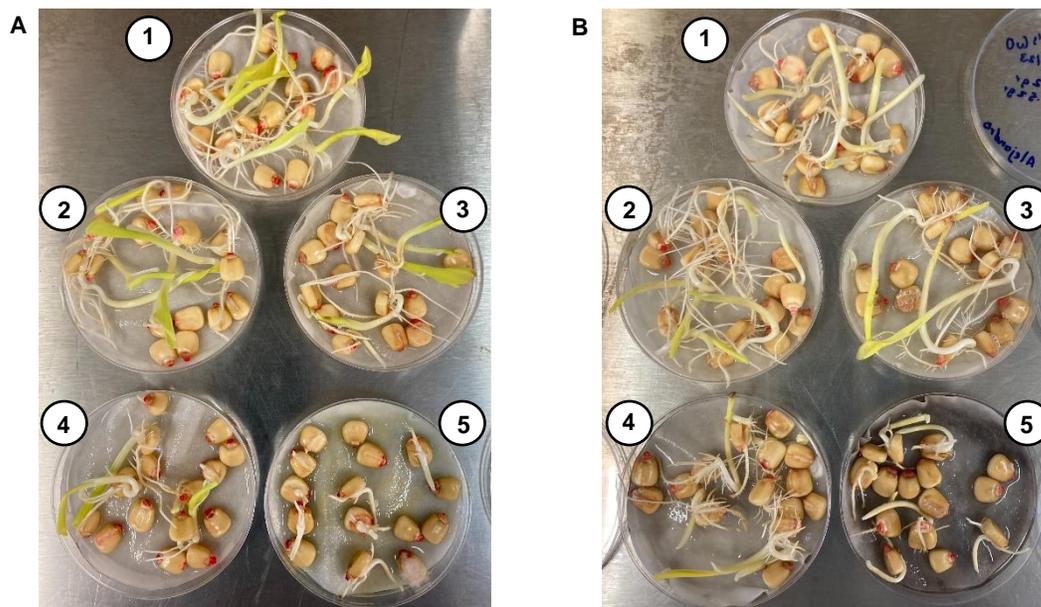


Figura 2. A) Cajas de Petri con una muestra representativa para cada tratamiento de nanopartículas de cobre. 1) 0 ppm, 2) 1ppm, 3) 10 ppm, 4) 100 ppm y 5) 1000 ppm. Se visualiza una disminución en el desarrollo de la plántula y la germinación de las semillas de maíz con respecto aumento la concentración. B) Cajas de Petri con una muestra representativa para cada tratamiento de nanopartículas de óxido de cobre (II). 1) 0 ppm, 2) 1ppm, 3) 10 ppm, 4) 100 ppm y 5) 1000 ppm. Se visualiza una disminución en el desarrollo de la plántula y la germinación de las semillas de maíz con respecto aumento la concentración.

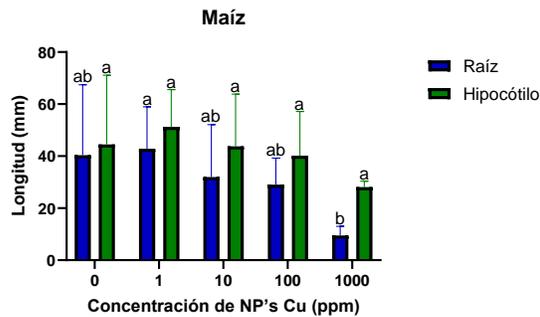


Figura 3. Efecto fitotóxico de NP's Cu en raíz e hipocótilo en plántulas de maíz. Las barras representan el crecimiento promedio de raíz e hipocótilo en mm. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ($p \leq 0.05$), $n=5$.

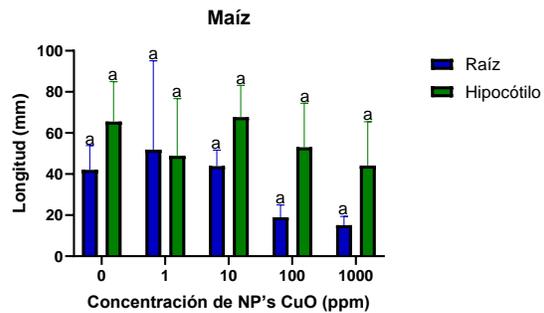


Figura 5. Efecto fitotóxico de NP's CuO en raíz e hipocótilo en plántulas de maíz. Las barras representan el crecimiento promedio de raíz e hipocótilo en mm. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ($p \leq 0.05$), $n=5$.

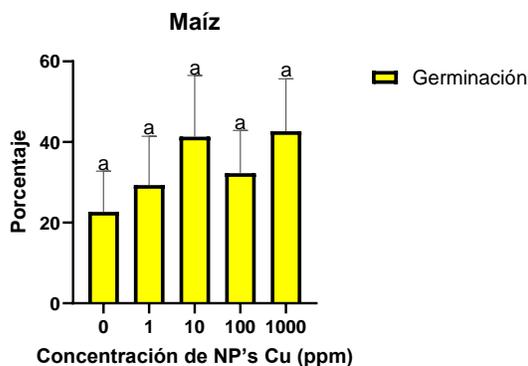


Figura 4. Efecto fitotóxico de NP's Cu en la germinación de semillas de maíz. Las barras representan porcentaje promedio de germinación. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ($p \leq 0.05$), $n=5$.

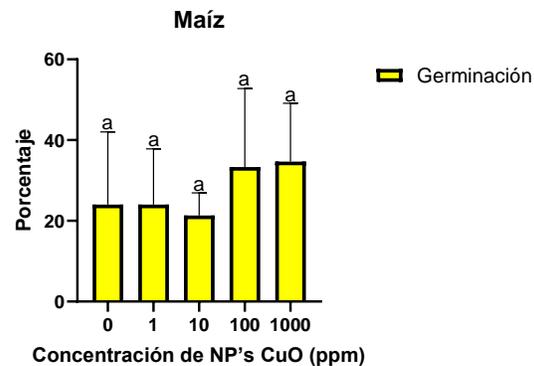


Figura 6. Efecto fitotóxico de NP's CuO en la germinación de semillas de maíz. Las barras representan porcentaje promedio de germinación. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ($p \leq 0.05$), $n=5$.

Germinación de semillas de maíz con exposición a nanopartículas de óxido de cobre

Las nanopartículas de óxido de cobre utilizadas fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (<50 nm). Los tres parámetros medidos para evaluar el efecto de las nanopartículas en el crecimiento de la semilla fueron la longitud de la raíz, la longitud del hipocótilo y el porcentaje de germinación. Los resultados obtenidos en una repetición de cada una de las concentraciones de NP's de CuO a las que se expusieron las semillas se muestran en la Figura 2B, en la cual a primera vista se puede deducir que conforme aumento la concentración de NP's CuO se afectó negativamente la germinación de la semilla de maíz.

El análisis estadístico se llevó a cabo en *Minitab Statistical Software v.21.4.1* y *GraphPad Prism 10*, y se realizó ANOVA de un solo factor con una confianza del 95%, utilizando la prueba *post-hoc* de Tukey HSD. Con respecto a la longitud de raíz, el ANOVA arrojó que las medias son significativamente diferentes para un $\alpha=0.05$, no obstante, el análisis con el método de Tukey que al controlar los errores Tipo I no se identificó la media diferente aceptando así la hipótesis nula de que todas las medias son iguales, pero se visualiza que el aumento en la concentración de NP's de CuO a partir de 1 ppm si disminuye la media de la longitud de la raíz (Figura 5), aunque las diferencias no fueron significativas con respecto al método de Tukey ($p > 0.05$). La longitud del hipocótilo no presentó diferencias estadísticas para un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ debido a que la posible traslocación de las NP's CuO no se realizó hasta el nivel del hipocótilo. El porcentaje de germinación de las semillas no presentó diferencias significativas con respecto al tratamiento control (0 ppm) en las diferentes concentraciones evaluadas de NP's de CuO (Figura 6).

Conclusiones

El aumento de las concentraciones de NP's de Cu y CuO no afectó negativamente el porcentaje de germinación, contrario a la idea previa concebida en donde se esperaba que aquellas cajas de Petri que fueron expuestas a mayor concentración de NP's tuvieran menor éxito en su germinación. Es decir, las semillas de maíz son capaces de llevar a cabo el proceso de germinación aun siendo expuestas al estrés de concentraciones altas de NP's de Cu y CuO, pero el efecto fitotóxico de estas nanopartículas es observado en el daño que las mismas causan a estructuras de la planta como la raíz.

La investigación realizada ha demostrado que concentraciones utilizadas en el estudio (1-1000 ppm) aplicadas en semillas de maíz en medio nutritivo de Hoagland, tras siete días de cultivo, no afectan de manera significativa el crecimiento de raíz e hipocótilo de las plántulas. Sin embargo, se observó una tendencia de disminución de raíz e hipocótilo, aunque no es significativa ($p > 0.05$) debido a la posible capacidad de las raíces de absorber NP's de Cu y CuO como micronutriente.

Las NP's de Cu utilizadas a concentración de 1 ppm han demostrado tener un ligero aumento con respecto al control en los parámetros de longitud de raíz e hipocótilo, lo que indica un posible beneficio donde el Cu confiere al crecimiento de la planta, al actuar como micronutriente y probablemente como antimicrobiano al inhibir el desarrollo de posibles agentes patógenos que retrasan el desarrollo de las plántulas.

Agradecimientos

Se agradece a la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por el apoyo económico otorgado para realizar la estancia del XXVII Verano De la Ciencia edición 2023. A la Lic. en Q.F.B. Claudia Karina Sánchez Sánchez por su orientación al ser encargada del Laboratorio de Evaluación Toxicológica y Riesgos Ambientales (LETRA) de la División de Ciencias Naturales y Exactas (DCNE). A CONAHCYT por el proyecto de infraestructura del Convenio 255270.

Bibliografía/Referencias

- Andreotti F., Mucha A.P. Caetano C., Rodrigues P., Rocha C.G., & Almeida M.R. (2015). *Interacciones between salt marsh plants and Cu nanoparticles – Efects on metal uptake and phytoremediation processes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 120. pp.303 – 309.
- Carlson D. (2019). *Illustration of the germination of a corn plant, which is a monocot*. Image. Life science illustration and more. Recuperado el 26 de julio 2023 de: www.Carlson-Art.com
- Escobar J.L.A., Ramírez O.R., Cisneros P.S. Gutiérrez R.D., Maldonado M.A.P. & Valenzuela J.L.L. (2021). *Viabilidad y germinación en semillas de maíz criollo del estado de Guerrero*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. No. 2. pp. 2
- Esparza Ponce, H. E., Lazos Martínez, R. J., Ornelas Gutiérrez, C. E., & González Rojano, N. (2014). *COMPARACIÓN DE TAMAÑO Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE ELECTRONES (MTE)*. *Simposio de Metrología 2014*, 1.
- Kirkby, E.A. and V. Römheld. 2007. *Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility*. *Proceedings 543, The International Fertilizer Society*, P. O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom
- Nabors, M. W., González-Barreda, P., García Antón, M., & Moreno Sáiz, J. C. (2005). *Introducción a la botánica*. Madrid: Pearson Educación. pp. 187 – 188.
- Nicolaza Pariona, L. A., Hermida-Montero, A., Martínez Enriquez, D., Sánchez-Rangel, G. C., López Lima, D., Rosas Saito, G., Rodríguez-Hass, B., & Duran-Barradas, Z. (2018). *Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos*. *ECIPERU*, 15(2), 109-116. <https://doi.org/10.33017/reveciperu2018.0017>
- Peng C., Duan D., Xu C., Chen Y., Sun L., Zhang H., Yuan X., Zheng L., & et al. (2015). *Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (Oryza sativa L.) plants*. *National Natural Foundation of China, Environmental Pollution*. Vol. 197. pp. 99 – 107.

Sánchez S.C.K. (2009). Efecto del selenio en la toxicidad del Cd y As en frijol (*Phaseolus vulgaris* C.). Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato, México 2009.