

Phytotoxicity of Cu nanoparticles (metallic and CuO) and CuSO₄ in germination and growth of *Phaseolus vulgaris* L. (black bean)

Fitotoxicidad de nanopartículas de cobre (metálico y CuO) y CuSO₄ en la germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol negro)

Mariana Robles Martínez¹, Andreea Itzayan González Alejandri¹, Juan de Dios Martínez Guzmán¹, Emilio Bustamante Amador¹, Leonardo Ornelas Frías¹, Gustavo Cruz Jiménez²

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

² Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.
m.robles.martinez@ugto.mx, adi.gonzalezalejandri@ugto.mx, jd.martinezguzman@ugto.mx, e.bustamante.amador@ugto.mx, l.ornelasfrias@ugto.mx, cruzg@ugto.mx

Resumen

Las nanopartículas de cobre son ampliamente utilizadas en la agricultura por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, por lo que es primordial saber cuál es el efecto que tienen para el crecimiento de algunas plantas, en este estudio se llevó a cabo la germinación de semillas del frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) con nanopartículas de cobre (en su forma metálica y CuO), así como CuSO₄ en solución, para posteriormente determinar las diferencias entre los efectos fitotóxicos entre las diferentes formas de Cu. Se encontró que el porcentaje de germinación es mayor en nanopartículas de Cu, pero el crecimiento de las raíces en las plántulas disminuye en todas las soluciones a partir de concentraciones mayores a 100 ppm, no importando la forma química del Cu. Asimismo, los tallos de las plántulas en presencia de nanopartículas de CuO tuvieron un mayor promedio de crecimiento y se observó un efecto fitotóxico significativo a partir de las 100 ppm de CuO ($p < 0.05$), en comparación con el control, para el caso de los tallos en presencia de Cu metálico y CuSO₄ disminuyó significativamente a partir de las 10 ppm al compararse con el control ($p < 0.05$). Finalmente se concluyó que el CuSO₄ en solución (que no se encuentra en forma de nanopartículas), produce mayores efectos fitotóxicos en comparación con las nanopartículas de Cu y CuO.

Palabras clave: nanopartículas, óxido de cobre, sulfato de cobre, toxicidad, *Phaseolus vulgaris*.

Introducción

Actualmente, las nanopartículas (NPs) metálicas se han convertido en una herramienta importante para diversas aplicaciones industriales, ambientales y agrícolas, debido a sus propiedades fisicoquímicas. Entre ellas, las nanopartículas de cobre (Cu-NPs) han destacado por su alta conductividad, capacidad antimicrobiana y su potencial como micronutrientes en cultivos, especialmente en condiciones de estrés abiótico (Anjum *et al.*, 2015). Sin embargo, el exceso debido al uso ha sido un foco de atención ante la preocupación como científicos sobre sus efectos tóxicos en organismos vegetales y sistemas ecológicos.

La fitotoxicidad hace referencia al daño que cualquier compuesto (químico, nanopartículas, metales, pesticidas, etc.) causa a las plantas independiente si hay presencia o ausencia de luz, esto puede afectar la germinación, el crecimiento radicular y el desarrollo de plántulas (Dietz & Herth, 2011). En el caso de las plantas, el cobre es un micronutriente esencial, pero en concentraciones elevadas puede inducir estrés oxidativo, dañar el ADN vegetal y alterar la morfología radicular (Wang *et al.*, 2015).

Phaseolus vulgaris L., comúnmente conocido como frijol, es una leguminosa cultivada en México y América Latina, tanto por su alto valor nutricional, bajo costo e impacto a la salud. Forma parte de la dieta básica de millones de personas en México por su alto contenido en proteínas, carbohidratos complejos, fibra, minerales como hierro y zinc, y compuestos bioactivos como antocianinas con propiedades antioxidantes. Además, su bajo costo lo convierte en una fuente asequible de nutrientes para sectores vulnerables, México se encuentra entre los principales productores de frijol a nivel mundial (Rincón Sánchez *et al.*, 2012).

Dada su sensibilidad a contaminantes metálicos, se ha utilizado como modelo para evaluar la toxicidad de nanopartículas de Cu metálico (NPs Cu), nanopartículas de óxido de cobre (NPs CuO) y el CuSO_4 (Aguillón Bárcenas *et al.*, 2022). Estudios recientes han demostrado que la respuesta de esta especie al cobre depende no solo de la concentración, sino también de la forma química del metal y del tamaño de partícula administrado (Peng *et al.*, 2015).

Con base a lo anterior, esta investigación tiene como objetivo evaluar comparativamente los efectos fitotóxicos de tres formas de cobre, dos en su forma de nanopartículas (NPs Cu y NPs CuO) y otro en su forma no nanoparticulada (CuSO_4) sobre la germinación y el desarrollo temprano de *Phaseolus vulgaris* L. en su variedad conocida en México como frijol negro. Esta evaluación permitirá comprender mejor los riesgos potenciales del uso de nanomateriales metálicos en sistemas agrícolas y su posible impacto en cultivos de importancia alimentaria.

Metodología

Semillas de *Phaseolus vulgaris* (frijol negro)

Se emplearon semillas comerciales de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.), marca “Morelos”, lote 05M4, adquiridas en un establecimiento comercial ubicado en el centro de la ciudad de Guanajuato, México. Previo a su utilización, las semillas fueron sometidas a un proceso de desinfección mediante inmersión en una solución de hipoclorito de cloro al 8% bajo agitación constante durante 30 minutos, utilizando una parrilla magnética. Este procedimiento tuvo como finalidad prevenir la contaminación microbiana y contaminar nuestro medio.

Preparación de solución nutritiva de Hoagland

Para preparar la solución nutritiva tipo Hoagland, se utilizaron 10 compuestos que aportan macronutrientes y micronutrientes necesarios para el crecimiento de las semillas. Para su preparación, se utilizó un vaso de precipitado de 500 mL al cual se añadieron 5 mL de cada solución madre correspondiente de los siguientes compuestos: CaCl_2 $2.14 \times 10^{-3} \text{ M}$, KNO_3 $2.55 \times 10^{-4} \text{ M}$, H_3BO_3 $2.31 \times 10^{-5} \text{ M}$, MnCl_2 $4.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, MoO_3 $6.95 \times 10^{-8} \text{ M}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ $3.70 \times 10^{-7} \text{ M}$, FeCl_3 $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, KH_2PO_4 $9.68 \times 10^{-4} \text{ M}$, MgCl_2 $9 \times 10^{-4} \text{ M}$ y CaSO_4 $2.96 \times 10^{-4} \text{ M}$. Se repite el procedimiento en la preparación de cada solución de cobre y para el blanco.

Germinación de semillas (control)

En un vaso de precipitado de 500 mL se agregó 50 mL de solución nutritiva, se aforó a 400 mL y se ajustó el pH a 5.8 utilizando soluciones de NaOH o HCl. Finalmente se aforó a 500 mL con agua desionizada en un matraz aforado, se le agregó 1.5 g de Phytigel y se vertió la solución a un frasco de vidrio para su posterior esterilización.

Para establecer el grupo control, se realizaron tres réplicas, distribuidas en contenedores de 1 L. A cada recipiente se adicionaron 125 mL de la solución anterior. Posteriormente, los contenedores se colocaron en una cámara de crecimiento controlado (BIOTRONETTE MARK III) durante 10 días a una temperatura constante de 25 °C y con ausencia de luz. A continuación, se incorporaron a una cámara de crecimiento durante 48 h bajo las mismas condiciones y con un fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h oscuridad. Finalizado el periodo de incubación, se contabilizaron y registraron las semillas germinadas.

Germinación en presencia de nanopartículas de cobre, óxido de cobre (II) y sulfato de cobre (II)

A partir de tres soluciones madre de NPs Cu, NPs CuO y CuSO_4 con una concentración de 10,000 ppm cada una, se prepararon soluciones de 1000, 100, 10, 1 y 0 ppm, a las cuales se les agregó 50 mL de solución nutritiva Hoagland, luego se ajustó su pH a 5.8 utilizando soluciones de NaOH o HCl y se aforaron a 500 mL con agua desionizada se le agregó 1.5 g de Phytigel y se vertió la solución a un frasco de vidrio para su posterior esterilización.

Para cada concentración, se dispusieron tres réplicas de 15 semillas en contenedores estériles, replicando las condiciones del grupo control para la germinación.

Esterilización

Los frascos con solución de NPs de cobre, NPs de CuO y CuSO₄, así como los materiales de laboratorio necesarios (pinzas de metal, embudos, frascos de vidrio), se esterilizaron en una autoclave a una temperatura de 121°C, durante 20 minutos a una presión 15 lb/in².

Los contenedores de plástico con capacidad de 1 L, usados para germinar las semillas, se esterilizaron con una solución de hipoclorito de cloro al 20%. A cada recipiente se le agregó una porción de la solución, esto bajo condiciones de esterilización y se dejó en exposición a la solución durante 30 minutos.

Medición de longitud de raíz, tallo y hoja

Finalizado el proceso de incubación, se inició con las mediciones correspondientes. Las plantas fueron retiradas del medio de cultivo y separadas cada una. Posteriormente, cada planta fue sumergida en ácido nítrico 0.1 M con la finalidad de eliminar posibles trazas de Cu y otros metales durante menos de 10 s y enseguida se sumergieron en agua desionizada para retirar el exceso de reactivo. Una vez limpias, se procedió al corte de las plantas separando las estructuras principales: raíz., raíces secundarias, tallo, cotiledones y hojas.

Estas secciones fueron medidas de manera individual utilizando un calibrador digital (Steren) obteniendo datos de longitud en milímetros. Después, se midió el contenido relativo de clorofila en hojas mediante un medidor de clorofila Minolta portátil, registrando los valores obtenidos para cada muestra en unidades SPAD, que posteriormente fueron normalizadas de acuerdo con la cantidad de clorofila en unidades SPAD considerando la concentración blanco de 0 ppm como 100 %. Finalmente, todas las porciones vegetales fueron colocadas en bolsas de papel y transferidas a un desecador (Hamilton Beach) a 60°C por 48 horas; con el objetivo de eliminar la humedad y preparar las muestras para futuros análisis de biomasa o contenido mineral.

Análisis estadístico

Se utilizó el software Minitab 19 para realizar el análisis estadístico, con el cual se realizó el ANOVA de una vía con un nivel de confianza del 95%, previamente se realizaron las pruebas de normalidad y homocedasticidad de los diferentes parámetros evaluados en el experimento. Asimismo, se realizaron pruebas de comparaciones de medias por el método de Tukey HSD para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes concentraciones de NPs de Cu, CuO y CuSO₄. Las gráficas de los resultados obtenidos en el análisis estadístico fueron elaboradas con el software GraphPad Prism 10.

Resultados y discusión

Germinación de semillas con exposición a nanopartículas de Cu, CuO y CuSO₄

Después de 12 días de germinación y crecimiento, se observaron altos porcentajes de germinación de *Phaseolus vulgaris* L. negro en presencia de NPs de Cu y CuO, así como CuSO₄. Es importante destacar que este porcentaje disminuía al tener una concentración de 1000 ppm, como se muestra en la Figura 1, en la cual se observa en general que los porcentajes más altos de germinación se obtuvieron con las NPs de Cu (Figura 1A) puesto que en todas las concentraciones se obtuvo al menos un 50% de germinación y sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En cuanto al CuO (Figura 1B), los porcentajes también fueron altos, pero se observa una diferencia significativa en la concentración de 1000 ppm ($p < 0.05$). Así mismo, el comportamiento de la germinación de las NPs de CuO es similar al observado en CuSO₄ en donde la germinación es significativamente menor en el tratamiento de 1000 ppm en comparación con las demás concentraciones ($p < 0.05$). Lo anterior indica que *Phaseolus vulgaris* L. es capaz de germinar en medios con NPs de Cu, CuO y CuSO₄, pero se observa un efecto negativo en el desarrollo de la planta a altas concentraciones de dicho metal. Estos resultados demuestran una mejor respuesta en comparación con lo

reportado al usar acetato de cobre II monohidratado, cuyo promedio en el porcentaje de germinación fue del 58% (Aguillón *et al.*, 2023).

Además, los resultados obtenidos en este análisis son similares a lo que se reporta en la bibliografía, en donde el uso de NPs de TiO_2 y ZnO en tomate promueve un buen crecimiento, pero a concentraciones menores de 250 mg/Kg. Mismo caso sucede con NPs de Fe en plantas de zacate, cebada y lino, cuyo porcentaje de germinación no fue inhibido a concentraciones menores de 250 mg/L (Arredondo J, 2016). Por lo que, si bien las nanopartículas de metales pueden aportar beneficios a la planta en su germinación, en altas concentraciones puede disminuir significativamente su crecimiento.

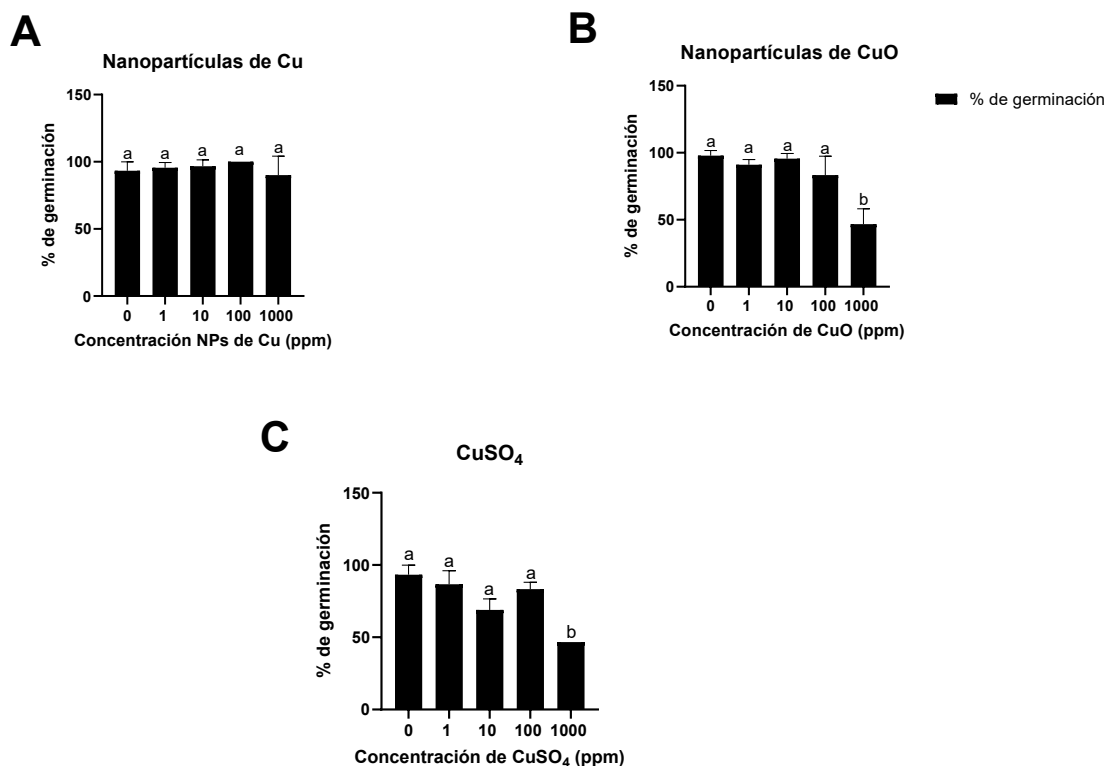


Figura 1. Porcentaje de germinación de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol negro) en presencia de (A) NPs Cu, (B) NPs CuO y (C) CuSO_4 en diferentes concentraciones de Cu. La altura de las barras indica el porcentaje promedio de germinación. Las barras de error muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos a diferentes concentraciones de cobre ($p < 0.05$), $n=3$.

Análisis de la longitud en tallos y raíces de plántulas expuestas a NPs de Cu, CuO y CuSO_4

La capacidad de germinación de una planta es característico de su calidad fisiológica y, por ende, demuestra su potencial para desarrollarse (Morales *et al.* 2017). En este estudio, se consideró como semilla germinada aquellas con al menos un crecimiento de 2 mm y como se describió anteriormente, se obtuvieron promedios de germinación altos, pero este no es el único parámetro que demuestra el impacto que tiene el Cu en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L., por lo que comparar la longitud de tallos y raíces permite tener un carácter cuantitativo más claro y así reconocer posibles daños fitotóxicos en la planta.

En la Figura 2 se muestran las longitudes de los tallos y raíces obtenidos, en donde se observa que para los tallos en presencia de NPs de Cu (Figura 2A) no hay diferencias significativas para las concentraciones de 0 a 10 ppm, pero a partir de 100 y 1000 ppm las diferencias son significativamente diferentes ($p < 0.05$). En las raíces, comienzan a tener diferencias a partir de la concentración de 100 ppm. Para el caso de CuO, el comportamiento es similar al caso anterior, pues los tallos presentan cambios significativos a partir de 1000 ppm, mientras que la longitud de las raíces tiene un cambio significativo a partir de 100 ppm ($p < 0.05$). Otra

diferencia importante es el promedio de la longitud, el cual es mayor en presencia de CuO, por lo que las plantas tuvieron un mayor crecimiento. En cuanto a las plantas que crecieron en CuSO₄ (Figura 2C), se percibe que sus longitudes obtenidas fueron las de menor tamaño en comparación con las NPs de Cu y CuO, lo que indica un mayor efecto fitotóxico ya que se presenta un crecimiento menor, como se puede apreciar en la Figura 2.

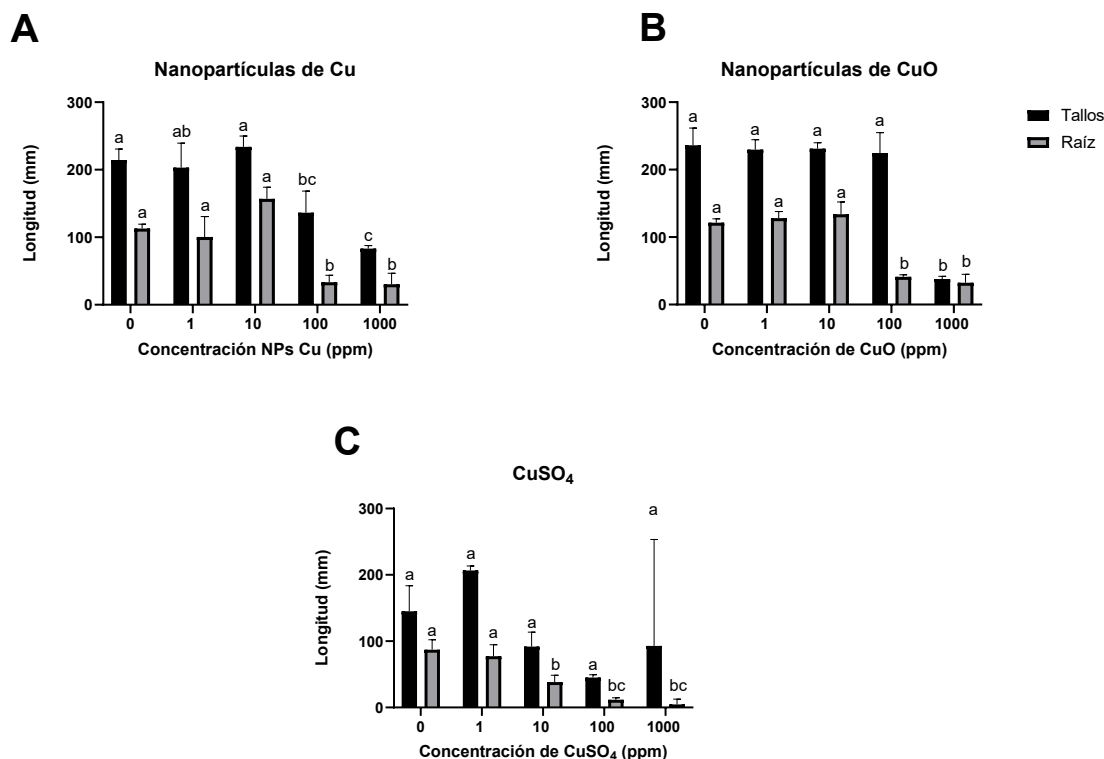


Figura 2. Efecto fitotóxico en la longitud de tallo y raíz de *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de (A), NPs Cu (B) NPs CuO y (C) CuSO₄ en diferentes concentraciones. La altura de las barras indica el porcentaje promedio de germinación. Las barras de error muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos a diferentes concentraciones de cobre ($p < 0.05$), $n=3$.

Análisis del porcentaje de clorofila en semillas expuestas a NPs de Cu, CuO y CuSO₄

La clorofila es un pigmento importante presente en las plantas que permite llevar a cabo la fotosíntesis, proceso de suma relevancia ya que se obtiene energía química a partir de energía luminosa; por lo que una planta con altos niveles de clorofila implica un metabolismo adecuado para la obtención de sus nutrientes (González *et al.*, 2008). En la Figura 3 se presentan los gráficos del nivel de clorofila producido por las plantas. De manera general se observa una misma tendencia en el porcentaje de clorofila, el cual disminuye a partir de la concentración de 100 ppm, lo que indica que a altas concentraciones no hubo suficiente producción de ésta, o bien, no se presentó un desarrollo adecuado de hojas, debido al efecto fitotóxico analizado previamente. De manera similar, en presencia de CuSO₄ (Figura 3C) se obtuvieron porcentajes muy bajos de clorofila, cuyos valores son menores al 15% con respecto a la concentración de 0 ppm. En cambio, en presencia de NPs de Cu y CuO, los porcentajes de clorofila son mayores lo que indica un menor efecto dañino. Cabe destacar que el porcentaje de clorofila obtenido en CuO (Figura 3B) es independiente de la concentración, ya que no hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$).

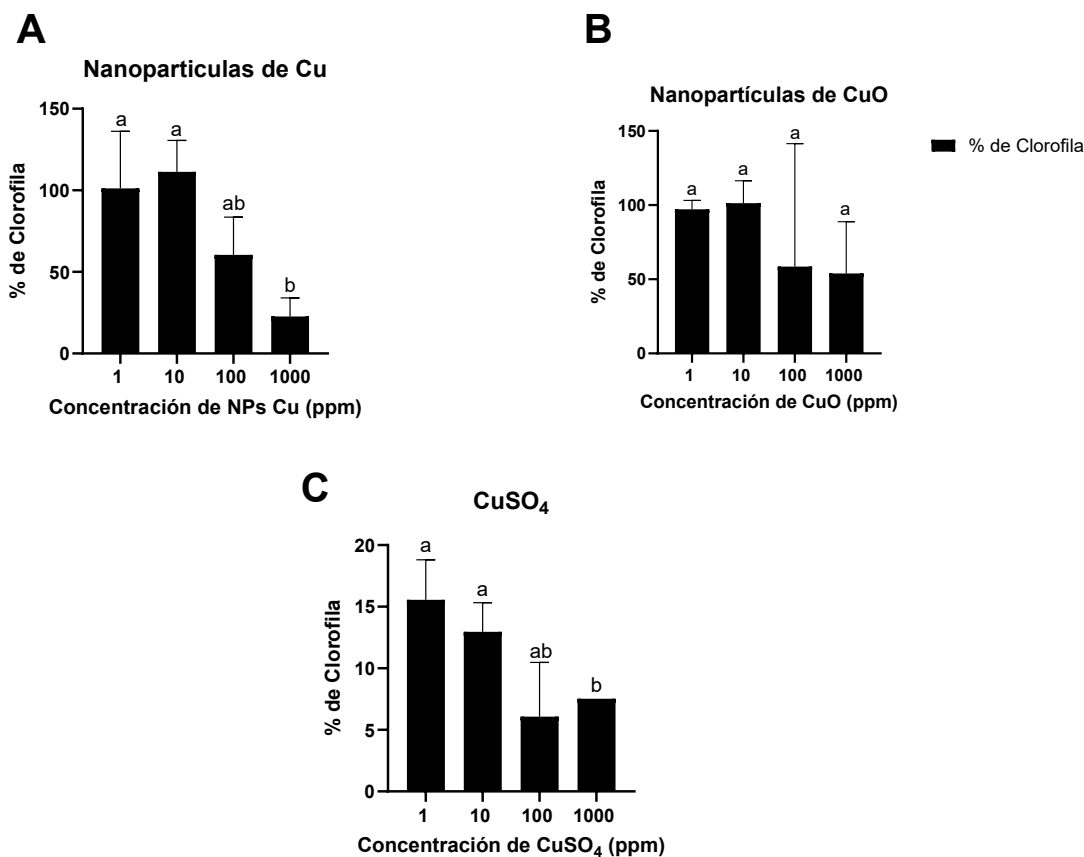


Figura 3. Porcentaje de clorofila presente en *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de nanopartículas de: (A), NPs Cu, (B) NPs CuO y (c) CuSO₄ en diferentes concentraciones. Las barras de error muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos a diferentes concentraciones de cobre ($p < 0.05$, $n=3$).

Análisis de la biomasa en tejido seco de semillas expuestas a NPs de Cu, CuO y CuSO₄

El cobre es un metal esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, pues participa en procesos bioquímicos tales como la fotosíntesis, respiración, respuesta al estrés oxidativo, metabolismo de la pared celular y señalización de hormonas, cofactor de varias enzimas, entre otros (Villegas *et al.*, 2015). De esta manera, se destaca la gran importancia que tiene la presencia de este metal, pero como se ha visto a lo largo del análisis, a concentraciones altas de cobre, ya sea en su forma de NPs de Cu, CuO o CuSO₄, hay un daño evidente en el desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. en altas concentraciones de Cu. Por lo anterior, para finalizar con el análisis fitotóxico, se comparó la biomasa en tejido seco producido por las semillas; estos resultados se muestran en la Figura 4, en la cual se tiene que la biomasa producida es independiente de la concentración de NPs de Cu (Figura 4A) y de CuO (Figura 4B) ya que no hay una diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo, se aprecia una mayor producción de biomasa en presencia de NPs de Cu. Sucede lo contrario en CuSO₄ (Figura 4C), donde la cantidad de biomasa es dependiente de la concentración porque existe una diferencia significativa en la producción de biomasa en 1000 ppm al compararse con las otras concentraciones ($p < 0.05$). Por lo tanto, el CuSO₄ presenta un mayor riesgo fitotóxico. Este resultado puede ser debido a la solubilidad de los metales, ya que el CuSO₄ es el más soluble, lo que provoca una mayor interacción en el medio nutritivo y a su vez con las plantas, además, el exceso de cobre causa estrés oxidativo en las plantas y consecuentemente incrementa la respuesta de antioxidantes debido al incremento de la producción de radicales libres de oxígeno altamente tóxicos (Villegas *et al.*, 2015).

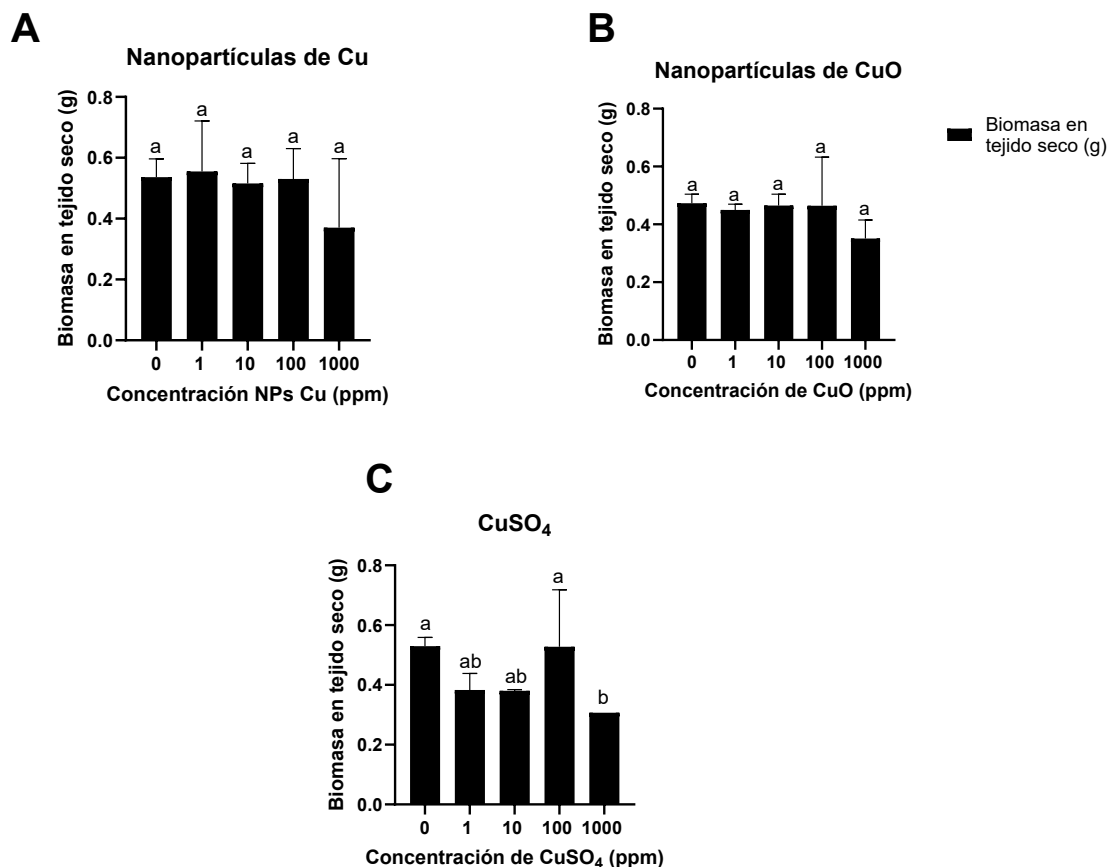


Figura 4. Biomasa producida en tejido seco de *Phaseolus vulgaris* L. al estar expuesto a: (A) NPs Cu, (B) NPs de CuO y (C) CuSO₄ en diferentes concentraciones. Las barras de error muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos a diferentes concentraciones de cobre ($p < 0.05$), $n=3$.

Conclusiones

Se analizó la fitotoxicidad de las NPs Cu, NPs CuO y CuSO₄ en el crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L., en su variedad frijol negro utilizando distintos parámetros como germinación, elongación (longitud) de tallos y raíces, contenido de clorofila y producción de biomasa en tejido seco. Se concluye que la germinación fue mejor en presencia de NPs de Cu. Sin embargo, el crecimiento de raíces y tallos de las plantas disminuye significativamente en todas las formas de Cu a partir de la concentración de 100 ppm al compararse con el tratamiento control ($p < 0.05$). En cuanto al porcentaje de clorofila, se encontró que la producción de este pigmento se reduce significativamente en presencia de NPs de Cu y CuSO₄ en 1000 ppm al compararse con el tratamiento control ($p < 0.05$). Así mismo, la cantidad de clorofila producida en presencia de CuO no tiene diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas ($p > 0.05$). La presencia de NPs Cu y NPs de CuO no tuvo un efecto significativo en la producción de biomasa, pero en el caso de la CuSO₄, se observó una disminución significativa en 1000 ppm con respecto al tratamiento control ($p < 0.05$). Finalmente se concluyó que el CuSO₄ en solución (que no se encuentra en forma de nanopartículas), produce mayores efectos fitotóxicos en comparación con las nanopartículas de Cu y CuO. Para complementar estos estudios se propone realizar la determinación de contenido de cobre en los tejidos de las plantas expuestos a NPs Cu, NPs CuO y CuSO₄.

Agradecimientos

Se agradece al apoyo otorgado por la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP) por la beca otorgada a la alumna de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo Mariana Robles Martínez, a la División de Ciencias Naturales y Exactas del Campus Guanajuato por las instalaciones y apoyo para otros alumnos durante el presente verano y a la QFB Claudia Karina Sánchez Sánchez por el apoyo técnico y humano brindado durante la realización del XXX Verano de la Ciencia.

Bibliografía/Referencias

- Anjum, N. A., Adam, V., Kizek, R., Duarte, A. C., Pereira, E., Iqbal, M., ... & Ahmad, I. (2015). Nanoscale copper in the soil-plant system—toxicity and underlying potential mechanisms. *Environmental Research*, 138, 306–325. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.019>
- Dietz, K. J., & Herth, S. (2011). Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11), 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.003>
- Morales, M., Peña, C., García, A., Aguilar, G., & Kohashi, J. (2017). Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*, 51(1), 43-62. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000100043&lng=es&tlng=es.
- Peng, C., Duan, D., Xu, C., Chen, Y., Sun, L., Zhang, H., Yuan, X., Zheng, L., Yang, Y., Ynag, J., Zhen, X., Chen, Y., & Shi, J. (2015). Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environmental Pollution*, 197, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.008>
- Rincón Sánchez, F., Osorio-Díaz, P., & Tovar, J. (2012). Frijol negro (*Phaseolus vulgaris*): Composición química, contenido de compuestos bioactivos y beneficios a la salud. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(5), 1007–1020. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v3n5/v3n5a10.pdf>
- Villegas, O., Domínguez, M., Martínez, P., & Aguilar, M. (2015). Cobre y Níquel, microelementos esenciales en la nutrición vegetal. *Revista de ciencias naturales y agropecuarias*, 2(2), 285-295.
- Wang, S., Liu, H., Zhang, Y., & 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. <https://academic.oup.com/etc/article-abstract/34/3/554/7761772?redirectedFrom=fulltext>