

Evaluation of the phytotoxicity of metallic copper and copper oxide II nanoparticles in the germination of *Capsicum annuum* (pepper) seeds

Evaluación de la fitotoxicidad de nanopartículas de cobre metálico y óxido de cobre II en la germinación de semillas de *Capsicum annuum* (chile de árbol)

José Saúl Medina Zapién¹, Karina Navarro Ortega², Emiliano Acevedo González², Mariana Alonso Ramírez¹, Alexis Daniel Funes Pérez¹, Matías Olvera Barrón¹, Juan Pablo Armando Rodríguez Ramírez¹, 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

js.medinazapien@ugto.mx, k.navarroortega@ugto.mx, e.acevedo.gonzalez@ugto.mx, m.alonsoramirez@ugto.mx, ad.funesperez@ugto.mx,
m.olverabarron@ugto.mx, jpa.rodriguezramirez@ugto.mx, cruzg@ugto.mx

Resumen

Las nanopartículas son herramientas de gran utilidad en la nanotecnología, se utilizan en diferentes sectores, principalmente el medio ambiente y la agricultura. Las nanopartículas (NPs) de metales y óxidos metálicos son utilizadas ampliamente en el sector agrícola debido a su actividad antimicrobiana. No obstante, la liberación de las NPs por diferentes actividades antropogénicas puede provocar una contaminación excesiva de estos materiales, generando altas concentraciones de NPs en suelos que potencialmente pueden ser tóxicas para los cultivos, afectando indirectamente a los organismos que los consumen, humanos y animales por medio de la cadena trófica. Por lo anterior, en el presente artículo se muestra un estudio de la fitotoxicidad de nanopartículas de cobre y óxido de cobre sobre la germinación de chile de árbol (*Capsicum annuum*), cultivo de gran importancia en México. Se evaluaron diferentes concentraciones de nanopartículas sobre semillas de chile de árbol, con el fin de determinar la fitotoxicidad que ejercen en su porcentaje de germinación, en la longitud y el área del tallo y la raíz de las plantas. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas en el porcentaje de germinación y en la longitud y área del tallo después de la exposición de las semillas de chile de árbol, independientemente del tipo de nanopartícula y la concentración. Sin embargo, la longitud y el área de las raíces disminuyen cuando aumenta la concentración y en concentraciones superiores a 100 ppm esta disminución es significativa con respecto al control ($p < 0.05$). Además, se observa en *C. annuum*, las nanopartículas de cobre resultan menos tóxicas que las nanopartículas de óxido de cobre.

Palabras clave: nanopartícula, cobre, óxido de cobre, fitotoxicidad, chile de árbol.

Introducción

Las nanopartículas (NPs) son objetos esféricos, compuestos por polímeros naturales o sintéticos y con un tamaño entre 1 y 100 nm. (Khan, Saeed, & Khan, 2019). Se ha demostrado que cuanto más pequeño sea el tamaño de las NPs, adquieren nuevas funciones y propiedades, lo cual acelera el desarrollo de nanomateriales, especialmente de inhibición microbiana (Pourmadadi, y otros, 2024). Es así como se han clasificado como una herramienta de importancia dentro de la nanotecnología, que puede ser aplicada en diferentes sectores como el medio ambiente, la agricultura, la industria alimentaria, la biotecnología, biomedicina, farmacéutica, entre otros. (Altammar, 2023).

El cobre (Cu) es un micronutriente esencial incorporado en una diversidad de proteínas y enzimas que cumplen un rol fundamental en la salud y nutrición de las plantas debido a sus propiedades conductoras excepcionales, así como un buen comportamiento catalítico (Kasana, Panwar, Kaul, & Kumar, 2017), de este modo, procesos como la fotosíntesis, respiración, desintoxicación de radicales superóxidos y lignificación ocurren gracias a componentes celulares que contienen cobre (Kirkby & Römheld, 2008). Por lo tanto, el desarrollo de NPs de cobre metálico ha cobrado importancia debido a sus aplicaciones generales como antimicrobianos, inhibiendo eficazmente el crecimiento de bacterias patógenas, así como contra varios hongos fitopatógenos, lo que las convierte en un buen candidato para la gestión de enfermedades en plantas (Kasana, Panwar, Kaul, & Kumar, 2017).

A la par que se han desarrollado NPs de cobre metálico, también se han estudiado NPs de óxido de cobre, las cuales son muy apreciadas en el sector industrial debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, atribuidas gracias a su gran superficie activa, y al efecto del tamaño cuántico. Estas características hacen que las nanopartículas de CuO sean indispensables para procesos de antioxidación y procesos antimicrobianos, por lo que en tiempos recientes se les atribuye su uso a la inhibición de crecimiento microbiano en plantas (Pourmadadi, y otros, 2024).

El chile de árbol (*Capsicum annuum*) pertenece a la familia *Solanaceae*, de origen mexicano y regiones de centroamérica. La planta requiere una temperatura entre 18-30°C para crecer adecuadamente, es exigente de luz y requiere un pH de suelo entre 5 y 7. Es una planta rica en nutrientes como calcio, fósforo, proteínas, potasio, vitamina C, vitamina E, vitamina B6, hierro y magnesio. Su uso más común es en la cocina y la industria alimentaria, siendo el condimento esencial en salsas y productos enchilados; además, es utilizado como colorante en alimentos y en la industria cosmética (FIRCO, 2017). La capsaicina es el principio activo característico del chile, que se encuentra mayoritariamente en su semilla como un mecanismo de defensa, y ha sido estudiado debido a sus efectos biológicos de relevancia farmacéutica, incluyendo propiedades cardio protectoras, efectos litogénicos, antiinflamatorios, analgésicos, termogénica, y beneficios adicionales en el sistema gastrointestinal. Incluso se ha demostrado potencial clínico en el alivio del dolor, prevención de cáncer y pérdida de peso (Srinivasan, 2016).

La presencia de nanopartículas durante la germinación de semillas de plantas puede resultar en la adsorción y absorción de estas partículas mediante sus raíces, así como su transporte a través de vías apoplásticas o simplásticas. Las nanopartículas pueden experimentar diversas reacciones debido al proceso de biotransformación; no obstante, la ocurrencia de estas reacciones está condicionada por las propiedades metálicas de las nanopartículas, las interacciones a escala nanométrica, el modo de exposición y la especie vegetal en estudio (Peng, y otros, 2015).

La liberación de nanopartículas metálicas en el medio ambiente durante las etapas de producción, uso y eliminación de productos que contienen estas partículas genera la necesidad de comprender su efecto fitotóxico y su interacción con plantas de interés comercial. Esta necesidad se deriva de la bioacumulación y biomagnificación de las nanopartículas metálicas, ya que estudios indican que su presencia en alimentos consumidos por animales o seres humanos puede representar riesgos potenciales para la salud humana debido a la toxicidad inherente de dichas nanopartículas. (Peng, y otros, 2015)

Debido a la necesidad de comprender a mayor detalle el efecto fitotóxico de las NPs sobre el crecimiento de plantas de importancia regional, se realizó el presente estudio, donde se describen los resultados de la fitotoxicidad generada por diferentes concentraciones de NPs de Cu y CuO en la germinación y crecimiento de plántulas de chile de árbol.

Materiales y métodos

Preparación de suspensión patrón de NPs de Cu y CuO

Las NPs empleadas fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (40-60 nm para NPs de Cu y < 50 nm para NPs de CuO). La suspensión patrón se obtuvo al pesar 1,000 mg de NPs de Cu en una 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 NPs de cobre; se cubrió con papel Parafilm y se almacenó para su uso posterior. Este mismo procedimiento fue replicado para la preparación de la suspensión de NPs de CuO, considerando su peso molecular al realizar los cálculos para obtener la suspensión patrón de 10,000 ppm de Cu.

Preparación de suspensiones de NPs de Cu y CuO para la siembra de semillas

Se prepararon 5 suspensiones de NPs de Cu a 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm, así como 5 suspensiones de NPs de CuO a las mismas concentraciones.

Primeramente, se preparó una solución nutritiva de Hoagland, añadiendo 0.5 mL de cada una de las siguientes soluciones en vasos de precipitados con capacidad de 100 mL: $3.57 \times 10^{-4} M$ Ca(NO₃)₂, $2.14 \times 10^{-3} M$ CaCl₂, $2.55 \times 10^{-4} M$ KNO₃, $2.31 \times 10^{-5} M$ H₃BO₃, $4.0 \times 10^{-6} M$ MnCl₂, $6.95 \times 10^{-8} M$ MoO₃, $3.7 \times 10^{-7} M$ Zn(NO₃)₂, $1.0 \times 10^{-5} M$ FeCl₃, $9.68 \times 10^{-4} M$ KH₂PO₄ y $9.0 \times 10^{-4} M$ MgCl₂. Después, en los mismos vasos de precipitados con la solución nutritiva de Hoagland se aforaron a 40 mL con agua desionizada. Enseguida se procedió a realizar diluciones seriadas de la suspensión patrón de NPs de Cu, adicionando 5 ml de la suspensión patrón hacia un vaso de precipitados con solución nutritiva de Hoagland, para después tomar 5 ml de este mismo vaso y transferirlo hacia otro vaso con solución nutritiva, repitiendo este procedimiento hasta obtener 4 suspensiones de nanopartículas a las concentraciones deseadas. Este mismo procedimiento fue replicado con la suspensión patrón de NPs de CuO; la solución control a 0 ppm de Cu y CuO no contiene NPs,

únicamente se adicionaron 45 ml de agua desionizada a la solución nutritiva. Una vez realizadas las diluciones seriadas se obtuvieron suspensiones de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de NPs, se procedió a ajustar el pH a 5.8 adicionando HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N según sea el caso con ayuda de un pHmetro digital BLE-C600. Finalmente, cada suspensión obtenida de NPs se aforó en matraces aforados de 50 ml con agua desionizada. El contenido de cada matraz aforado con las suspensiones de NPs fue depositado en matraces Erlenmeyer de 300 ml y se taparon con papel Parafilm para su uso posterior.

Durante el procedimiento de la realización de las diluciones seriadas, tanto la suspensión patrón como las suspensiones que fueron preparadas se mantuvieron en sonicación con ayuda de un sonicador DK SONIC, con el fin de asegurar la suspensión homogénea de las NPs.

Germinación de semillas con exposición a NPs de Cu y CuO

Las semillas de chile de árbol utilizadas fueron adquiridas en sobres de un comercio local en Guanajuato, México. Para la esterilización de las semillas, se contaron un total de 600 semillas y se dispusieron en un vaso de precipitados de 250 ml, se les adicionó 100 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 8% y se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos empleando un agitador magnético previamente esterilizado y una parrilla de agitación magnética; el vaso de precipitados fue tapado con aluminio para evitar que algún contaminante entrase durante el proceso de agitación.

La siembra de las semillas se realizó en cajas de Petri, colocando un papel filtro seco sobre la base de la caja Petri y añadiendo 3 ml de la suspensión de NPs correspondiente con ayuda de una micropipeta con capacidad de 1000-5000 μ l, asegurándose de sonicar la suspensión para una distribución homogénea de las NPs; seguido de esto, se colocaron 15 semillas estériles previamente filtradas con un embudo que contiene una gasa, y se distribuyeron sobre el papel filtro humectado con la suspensión con ayuda de unas pinzas metálicas; finalmente se colocó otro papel filtro sobre las semillas y se adicionó nuevamente 3 ml de la misma suspensión de NPs empleada anteriormente, se cerró la caja de Petri y se pesó en una balanza analítica, etiquetando la caja con su peso total y sus debidas especificaciones para ser almacenada. Para cada suspensión de NPs de Cu y CuO (0, 1, 10, 100 y 1000 ppm), se realizaron 4 repeticiones con 15 semillas cada una, generando un total de 40 cajas de Petri y 600 semillas sembradas. Las semillas fueron dispuestas en una cámara ambiental BIOTRENETTE MARK III LAB-LINE a temperatura constante de 25°C durante 21 días, realizando el riego de las semillas con agua destilada estéril y colocando la cantidad de agua necesaria para igualar el peso total inicial de la caja de Petri. Durante todo el procedimiento de siembra y riego de semillas, se trabajó en condiciones de esterilidad, y el material empleado fue esterilizado en autoclave por vía húmeda a 15 lb/in² durante 20 minutos.

Medición de la longitud de raíz y tallo de las semillas germinadas

Las plántulas fueron cosechadas después de 21 días en la cámara ambiental, las semillas y plántulas fueron extraídas de la caja de Petri y dispuestas sobre un papel negro para realizar la medición de la longitud del tallo y la raíz en milímetros de aquellas semillas que germinaron con ayuda de un vernier digital. Adicionalmente, se tomó una foto de todas las semillas y plántulas dispuestas en la caja de Petri con la cámara de un teléfono celular Samsung Galaxy M31 para su posterior análisis en software. Este procedimiento se realizó con todas las cajas que contienen las semillas a diferentes concentraciones de NPs de Cu y CuO, descartando aquellas que se encontraron contaminadas con microorganismos.

Medición del área de raíz y tallo de las semillas germinadas

Con las diferentes fotos tomadas de las semillas sembradas en las cajas de Petri, se realizó la medición del área de la raíz y el tallo de cada semilla que logró germinar empleando el software "ImageJ" (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012), ajustando una escala en mm² y realizando el registro de cada área.

Análisis estadístico

Se utilizó el software Minitab 19 para realizar el análisis estadístico correspondiente, se utilizó ANOVA de un solo factor con un nivel de confianza del 95% para determinar la normalidad y la varianza de los diferentes parámetros evaluados en el experimento, así como se realizaron pruebas de comparaciones de medias por el método de Tukey HSD para determinar diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de NPs de Cu y CuO. 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 NPs de Cu y CuO

Después de 21 días en la cámara ambiental, las semillas de chile de árbol expuestas a NPs de Cu y CuO lograron germinar adecuadamente en cada una de las concentraciones estudiadas (**Figura 1**), observando que el porcentaje de germinación (**Figura 2**) es independiente de la concentración de NPs de Cu y CuO, pues no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p > 0.05$). La germinación de las semillas es el primer paso determinante del crecimiento de las plantas en medios contaminados con NPs de diferentes metales y óxidos de metales. De manera general, la bibliografía reportada indica que la fitotoxicidad de las NPs reducen la tasa de germinación de algunas especies, como la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el nabo (*Brassica rapa* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y habas (*Vicia faba* L.); utilizando NPs de plata (Ag), disminuyendo de 10-20% su tasa de germinación. Similarmente, en el caso de las NPs de óxidos metálicos, se ha reportado una disminución en la tasa de germinación de lechuga (*Lactuca sativa*), rábano (*Raphanus sativus* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.), adsorbiendo las NPs en la superficie de las semillas y liberando iones metálicos libres cerca de las semillas (Rizwan, y otros, 2017). En las semillas de *C. annuum*, no se observó fitotoxicidad en las concentraciones estudiadas de NPs de Cu y CuO, por lo que el chile de árbol presenta una buena resistencia en su tasa de germinación ante la contaminación de cobre en el medio. Se ha reportado que tanto las NPs de Cu como las de CuO no afectan en gran medida la tasa de germinación en diferentes plantas por ser un micronutriente esencial, de hecho, en algunos casos puede favorecer a la germinación a concentraciones relativamente bajas de NPs (Kasana, Panwar, Kaul, & Kumar, 2017).

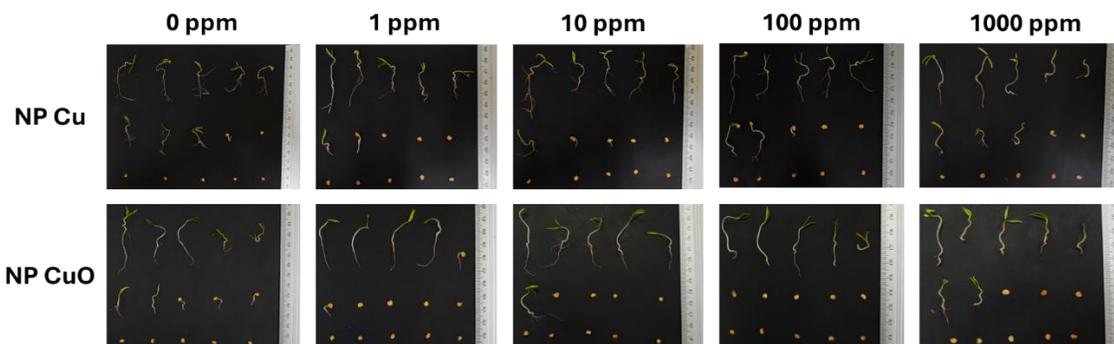


Figura 1. Germinación de semillas de chile árbol expuestas a diferentes concentraciones de NP de Cu y CuO. Cada fotografía pertenece a las semillas cultivadas en una sola caja de Petri para cada concentración.

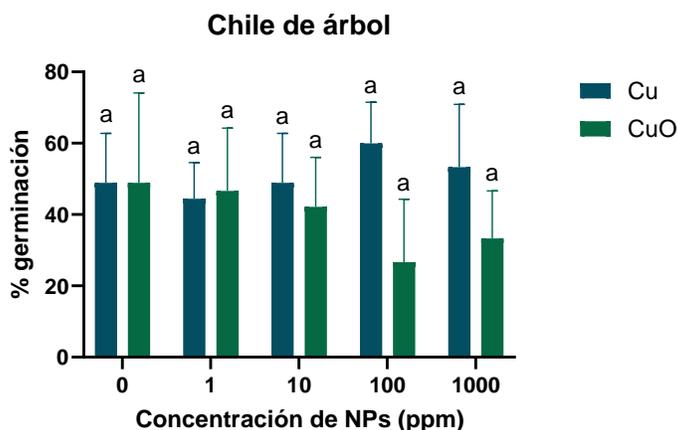


Figura 2. Efecto fitotóxico de NPs de Cu y CuO en la germinación de semillas de chile de árbol. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ($p \leq 0.05$), $n=4$.

Análisis de la longitud y el área en raíces y tallos de semillas expuestas a NPs de Cu y CuO

El análisis de parámetros como la longitud y el área de las raíces y tallos en las plántulas, son indicadores claros de la salud general de las plantas (Rizwan, y otros, 2017), por lo que es necesario observar el comportamiento de estos parámetros en el chile de árbol cuando es expuesto a NPs de Cu y CuO.

De acuerdo con lo observado en la **Figura 3**, la presencia de diferentes concentraciones de NPs de Cu y CuO (0-1000 ppm) en el medio no afecta de manera significativa a la longitud del tallo de las semillas, pues en ambos casos (**Figuras 3A y 3B**) el análisis estadístico indicó que no hay diferencias significativas en las medias de la longitud de los tallos de las plantas en los diferentes tratamientos ($p > 0.05$). No obstante, la longitud de las raíces sí presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), indicando que las NPs a diferentes concentraciones tienen efecto sobre el tamaño de la raíz. Diferentes estudios han demostrado que las plantas pueden tomar NPs de metales y óxidos metálicos presentes en el medio a través de contacto foliar, logrando penetrar hacia la semilla debido a su pequeño tamaño y adhiriéndose a la superficie de las raíces, entrando tanto a la corteza como a la epidermis por rutas apoplásticas; este fenómeno varía dependiendo de la especie, el cultivo y las condiciones de crecimiento (Rizwan, y otros, 2017). Por lo tanto, este experimento sugiere que las NPs de Cu y CuO logran penetrar las semillas del chile de árbol, y son retenidas en sus raíces, pues son el primer componente de la planta con el que las NPs entran en contacto; de este modo, la toxicidad producida por las NPs afecta únicamente la raíz, sin ser translocadas hacia el tallo de las plantas y evitando que afecte su tamaño.

Por otra parte, el efecto fitotóxico observado de las NPs en las raíces de las plantas nos muestra que las NPs de Cu son asimiladas de mejor manera que las de CuO, obteniendo una mayor diferencia entre las medias de cada tratamiento. Los autores han sugerido que los iones de cobre liberados a partir de las NPs de CuO tienen un mayor efecto fitotóxico que las NPs de cobre metálico (Rizwan, y otros, 2017), debido posiblemente a que los iones metálicos causan un estrés iónico en las plantas, desencadenando inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos tiol (-SH) de las proteínas (Prieto-Méndez, González Ramírez, Román Gutiérrez, & Prieto-García, 2009). En cuanto al efecto de la concentración, en los tratamientos con NPs de Cu a diferentes concentraciones se observaron fluctuaciones en la longitud de las raíces, obteniendo diferencias significativas en concentraciones de 1, 10 y 1000 ppm respecto al control, siendo el tratamiento más tóxico aquel con 1000 ppm de NPs de Cu (**Figura 3A**), por lo que se deduce que a concentraciones de 0-100 ppm no hay un comportamiento claro de la toxicidad, sin embargo a partir de 1000 ppm el efecto tóxico afecta significativamente a la longitud de las raíces del chile de árbol ($p < 0.05$); por otro lado, se observa una tendencia clara en el aumento de la longitud de las raíces entre 0-10 ppm de NPs de CuO, y posteriormente ocurre una clara disminución en la longitud entre 100-1000 ppm (**Figura 3B**), indicando que la fitotoxicidad de NPs de CuO es más evidente que la fitotoxicidad de Cu, debido posiblemente al estrés iónico que provoca la liberación de iones de cobre a partir de las NPs de CuO. Por lo que en general, podemos decir que el chile de árbol aprovecha de mejor manera, además de que posee mejor tolerancia, ante las NPs de Cu en comparación a las NPs de CuO.

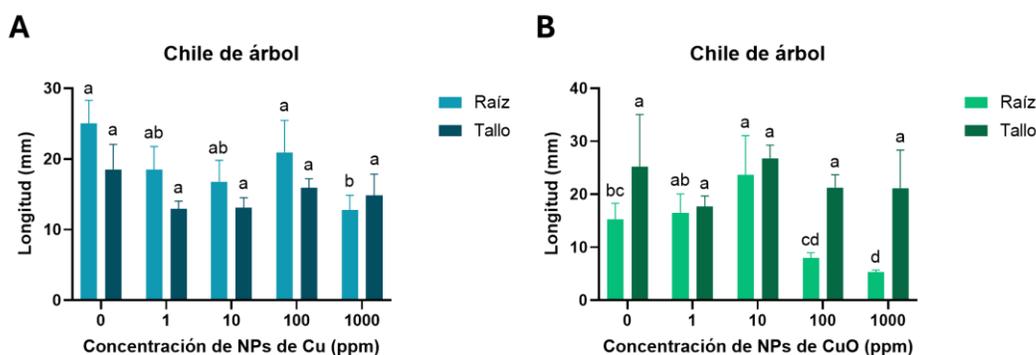


Figura 3. Efecto fitotóxico de NPs de Cu y CuO sobre la longitud de raíz y tallo en semillas de chile de árbol. A) Efecto de NPs de Cu; B) Efecto de NPs de CuO. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ($p \leq 0.05$), $n=4$.

Respecto al área de las raíces y los tallos en las plantas de chile de árbol que lograron germinar, en la **Figura 4** se logra observar que, nuevamente, el tallo no es afectado por la fitotoxicidad que implican las NPs de Cu y CuO ya que no logran translocar de la raíz hacia el tallo, por lo que no se visualizan diferencias significativas ($p > 0.05$) en las medias de los tallos en los distintos tratamientos (Rizwan, y otros, 2017). Sin embargo, las raíces sí sufren cambios respecto al tipo de NPs y a la concentración. En cuanto al efecto de la concentración, la toxicidad de las NPs de Cu sobre el área de las raíces es más clara (**Figura 4A**), donde a medida que incrementa la concentración de Cu, disminuye el área, sin embargo en concentraciones mayores de 100 ppm de NPs de Cu reduce significativamente el área de la raíz del chile de árbol ($p < 0.05$); mientras tanto, las NPs de CuO incrementan significativamente el área de las raíces entre 1-10 ppm, y

disminuye significativamente ($p < 0.05$) al comparar con el control a partir de 100-100 ppm (**Figura 4B**). Sin embargo, aunque con las NPs de Cu se haya visualizado más claramente un efecto fitotóxico en las raíces de las plantas, los valores en las medias de los tratamientos con Cu son más altos que aquellos en los que se utiliza CuO, por lo que nuevamente podemos decir que las NPs de CuO son más tóxicas para el chile de árbol que las de Cu, debido al estrés iónico que causan (Prieto-Méndez, González Ramírez, Román Gutiérrez, & Prieto-García, 2009).

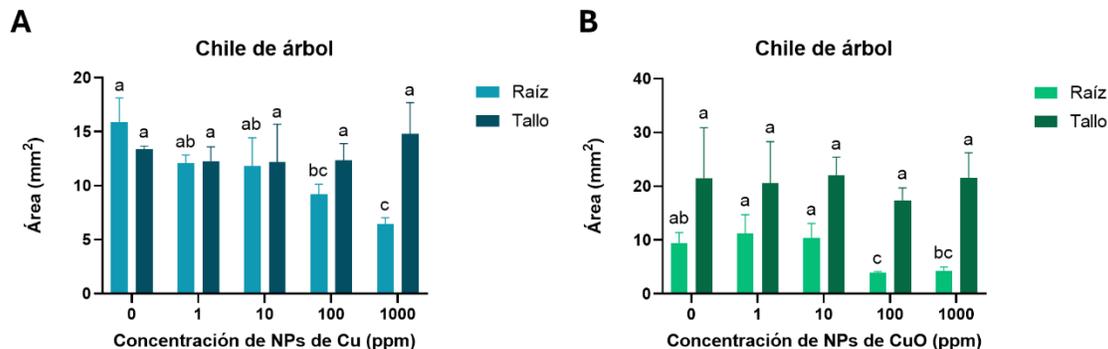


Figura 4. Efecto fitotóxico de NPs de Cu y CuO sobre el área de raíz y tallo en semillas de chile de árbol. A) Efecto de NPs de Cu; B) Efecto de NPs de CuO. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ($p \leq 0.05$), $n=4$

Conclusiones

Se realizó un estudio fitotóxico de exposición de nanopartículas de cobre y óxido de cobre en diferentes concentraciones a semillas de chile de árbol, obteniendo que el porcentaje de germinación, así como la longitud y el área del tallo, no son afectados significativamente por el tipo o concentración de nanopartícula. Por otra parte, la raíz se ve afectada tanto por el tipo de nanopartícula como por la concentración, obteniendo que las nanopartículas de óxido de cobre resultan más tóxicas que las de cobre por el posible estrés iónico que causa en la planta; en cuanto a la concentración, las raíces logran desarrollarse mejor a concentraciones entre 0-10 ppm, pero a concentraciones superiores de 100 ppm el desarrollo de la raíz del chile de árbol es afectado tanto en longitud como en área. Se considera necesario realizar estudios más profundos, tales como estudios de bioacumulación, para lograr obtener resultados aún más precisos.

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 XXIX Verano de la Ciencia Edición 2024. A la Q.F.B. Claudia Karina Sánchez Sánchez por su experiencia y orientación en el Laboratorio de Farmacia de la División de Ciencias Naturales y Exactas (DCNE). A CONAHCYT por el proyecto de infraestructura del Convenio 255270.

Bibliografía/Referencias

- Altammar, K. A. (2023). A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 14, 01-20.
- FIRCO. (2017). *Chile, producto tradicional de la gastronomía mexicana*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/firco/articulos/chile-producto-tradicional-de-la-gastronomia-mexicana>
- Kasana, R. C., Panwar, N. R., Kaul, R. K., & Kumar, P. (2017). Biosynthesis and effects of copper nanoparticles on plants. *Environmental Chemistry Letters*, 15, 233-240.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Kirkby, E., & Römheld, V. (2008). Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. *Informaciones agrónomicas*(68), 1-6.

- Peng, C., Duan, D., Xu, C., Chen, Y., Sun, L., Zhang, H., . . . Zheng, L. (2015). Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environmental pollution*, 197, 99-107.
- Pourmadadi, M., Holghoomi, R., Shamsabadipour, A., Maleki-Baladi, R., Rahdar Abbas, & Sadanand, P. (2024). Copper nanoparticles from chemical, physical, and green synthesis to medicinal application: A review. *Plant Nano Biology*, 8, 1-17.
- Prieto-Méndez, J., González Ramírez, C., Román Gutiérrez, A., & Prieto-García, F. (2009). CONTAMINACIÓN Y FITOTOXICIDAD EN PLANTAS POR METALES PESADOS PROVENIENTES DE SUELOS Y AGUA. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 29-44.
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M., Ok, Y., Adrees, M., Ibrahim, M., . . . Abbas, A. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: a critical review. *Journal of hazardous materials*(322), 2-16.
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9, 671-675.
- Srinivasan, K. (2016). Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Food Science and Nutrition*, 56(9), 1488-1500.