

## Evaluación de los efectos fitotóxicos de partículas finas de óxido de cobre(II) en *Phaseolus vulgaris* (frijol negro)

Alondra J. Aguillón Bárcenas<sup>1</sup>, María Isabel Duarte Velázquez<sup>2</sup>, Cynthia Denisse Caudillo Yebra<sup>3</sup>, Gustavo Cruz Jiménez<sup>4</sup>

<sup>1,2</sup>Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

<sup>3</sup>Licenciatura en Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

<sup>4</sup>Departamento de Farmacia, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

aj.aguilonbarcenas@ugto.mx<sup>1</sup>

mi.duartevelazquez@ugto.mx<sup>2</sup>

cd.acudilloyebra@ugto.mx<sup>3</sup>

cruz@ugto.mx<sup>4</sup>

### Resumen

Las nanopartículas de cobre son ampliamente utilizadas en la agricultura por sus propiedades antibacteriales y antifúngicas, por lo que es primordial saber cuál es el efecto que tienen para el crecimiento de algunas plantas, en este caso de *Phaseolus vulgaris*, que actualmente en México es de los productos con mayor producción y consumo. En este trabajo se llevó a cabo la germinación de semillas del frijol negro sometidas a dos tratamientos con cobre, el primero en forma de acetato de cobre (II) monohidratado y un segundo con partículas finas de cobre de 150 nm (cercano al tamaño de las nanopartículas), para posteriormente determinar las diferencias con respecto a su crecimiento y evaluar posibles efectos fitotóxicos que trae consigo la utilización de este metal en diversas concentraciones y tamaños de partícula. Los resultados de esta investigación arrojaron que las partículas finas de cobre pueden ser tanto benéficas como perjudiciales para el crecimiento de las semillas de frijol negro dependiendo de su concentración ya que en concentraciones pequeñas de 1 ppm se observó un mayor crecimiento, sin embargo, durante todo el tratamiento, el crecimiento de semillas presentó un índice de fitotoxicidad elevado de acuerdo con el índice propuesto por Bagur.

**Palabras clave:** nanopartícula, radícula, hipocótilo, *Phaseolus vulgaris*, germinación.

### Introducción

Las nanopartículas (NPs) son materiales que miden entre 1 a 100 nm y han tomado un realce en los últimos años. Una de estas NPs son las de cobre, que según Guzmán (2020), tiene excelentes propiedades físicas y químicas que se diferencian de las partículas de mayor tamaño. Existen algunos artículos, en los que se ha estudiado las diversas interacciones de las nanopartículas de cobre (NPs Cu) con el medioambiente, las bacterias y las plantas por mencionar algunas. Aunado a esto, Lavicoli (2014) estudió la hormesis en la nanotecnología, observando que a ciertas dosis aparecen ciertas respuestas, que dependen de las propiedades del agente y de la especie con la que se esté trabajando. Otro punto para considerar fue el expuesto por Barrera *et al.* (2009), ya que mencionan que los efectos tóxicos de algunas NPs están ligados con la interacción con el disolvente.

Entrando de lleno a las plantas, Dietz (S.F) menciona que las NPs necesitan tener un tamaño máximo de 5 nm para que puedan ser absorbidas por la planta, además demostró que este proceso ocurre por endocitosis, dependiendo de la superficie de la célula y el material de la NP. Aunado a esto, Peng *et al.* (2015) investigaron el comportamiento de NP de Cu en plantas de arroz, observando que el Cu se desplaza a la epidermis, la exodermis y la corteza de la raíz, para poder alcanzar la endodermis, además concluyeron que este proceso se vio beneficiado por la formación de raíces laterales. Por otro lado, si bien existen numerosos estudios acerca de la fitorremediación - utilizan plantas para remediar lugares contaminados-, en este estudio abordaremos la parte fitotóxica. Por ejemplo, las NPs Cu pueden ser capaz de dañar el DNA de las plantas mediante interacciones redox directas, así mismo, Le Van y colaboradores (2016) estudiaron el efecto del CuO en dos especies de algodón y observaron que éste inhibe el crecimiento en ambas especies afectando parámetros como altura, longitud de raíz, número de raíces y biomasa. Además, en este mismo estudio, el CuO aumentó la expresión de la proteína de la *toxina Bt*, la cual es un excelente plaguicida. En el presente

estudio, se trabajará con dos experimentos, el primero con acetato de cobre y el segundo con partículas de cobre finas de 150 nm, muy cercanas al tamaño de NPs Cu para observar si existen diferencias en los efectos con respecto al cobre (II).

## Materiales y métodos

### Semillas de frijol negro

Las semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) fueron adquiridas en una tienda comercial en Guanajuato capital, de la marca "Morelos" del lote 05M4, con una fecha de caducidad correspondiente al 04 de febrero de 2023. Cabe resaltar que las semillas fueron esterilizadas previas a su uso para evitar posible contaminación, para esto se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 8%, en agitación constante por 30 minutos en una parrilla magnética.

### Germinación de semillas (blanco)

Primeramente, se llevó a cabo la germinación del blanco, se realizaron 4 réplicas de 10 semillas cada una en cajas Petri, que contenían papel filtro tanto arriba como abajo, previamente esterilizados. Se añadieron 6 mililitros de agua desionizada esterilizada y posteriormente se colocaron en una cámara ambiental (BIOTRONETTE MARK III) durante 48 horas a  $24 \pm 1$  °C, se les agregó 8 mililitros de agua desionizada estéril y se regresaron a la cámara ambiental durante otras 48 horas más a  $24 \pm 1$  °C. Pasado el tiempo se retiraron de la cámara y se procedió a medir las semillas germinadas.

### Germinación de semillas con acetato de cobre (II) monohidratado

Se realizaron soluciones a partir de una solución patrón de 10,000 ppm de Cu (II) en una solución nutritiva de Hoagland modificada a pH = 5.00, obteniendo concentraciones de 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm y 0 ppm. Así, obteniendo 5 concentraciones diferentes, se realizó el cultivo de 4 repeticiones de 10 semillas cada una en cajas Petri con papel filtro previamente esterilizado y se reprodujo el mismo procedimiento que las semillas blanco.

### Germinación de semillas con nanopartículas de óxido de cobre (II)

Las nanopartículas utilizadas fueron obtenidas en la Ciudad de León, Gto. del Laboratorio del Dr. Juan Luis Pichardo M. en el Centro de Investigaciones de Óptica (CIO). Estas nanopartículas de CuO son de un tamaño promedio de 150 nm. Al recibirlas se sometieron a sonicación por 15 minutos para obtener una suspensión de partículas de CuO.

Se realizaron únicamente 3 soluciones con concentraciones diferentes, igualmente complementadas con solución nutritiva de Hoagland modificada y a pH = 5.00, siendo estas de: 10 ppm, 1 ppm y 0 ppm. Cada solución posterior a su esterilización se sometió a sonicación para obtener una suspensión de partículas homogénea. Debido a la cantidad disponible de NPs se optó por realizar solamente tres repeticiones de cada una de las concentraciones. De igual manera se repitió el mismo procedimiento que con el cultivo de las semillas blanco.

### Análisis estadístico

Se realizó el procedimiento de acuerdo con la US EPA Bagur *et al.* (1996) que nos indica a partir de la germinación de las semillas (SG) y el alargamiento de la raíz (RE) la toxicidad que puede haber en las plantas a partir de las fracciones contaminantes que se encuentran en el agua. A partir de los datos obtenidos se midieron los índices de toxicidad:

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

$$SG = (\text{Germ}_{\text{muestra}(i)} - \text{Germ}_{\text{control}}) / \text{Germ}_{\text{control}} \quad (1)$$

Donde  $\text{Germ}_{\text{muestra}(i)}$  es el número de semillas germinadas en la solución saturada  $i$  (%), y  $\text{Germ}_{\text{control}}$  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.

$$RE = (\text{Elong}_{\text{muestra}(i)} - \text{Elong}_{\text{control}}) / \text{Elong}_{\text{control}} \quad (2)$$

Donde  $\text{Elong}_{\text{muestra}(i)}$  es la longitud media de las raíces de las semillas en el extracto de saturación  $i$  (cm), y  $\text{Elong}_{\text{control}}$  es la longitud de las raíces de semillas en el blanco control (cm).

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
- (d) - 0,75 a -1 muy alto.

RE valores  $> 0$  indicaría la estimulación del crecimiento de la semilla (hormesis)

Para probar si existen diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía. Para encontrar diferencias entre pares de tratamientos, se utilizó el método de comparaciones múltiples de Tukey HSD (Honestly Significant Difference). En todos los casos se consideraron diferencias significativas para  $p < 0.05$ . El programa GrahPad se utilizó para realizar los gráficos de los tratamientos y el programa MINITAB para los análisis estadísticos de ANOVA y Tukey, así como para realizar las pruebas de normalidad, homogeneidad e independencia.

## Resultados y discusión

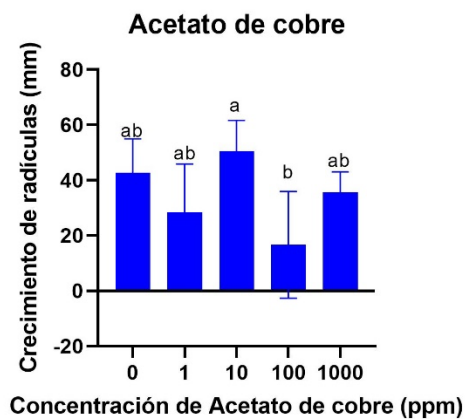
### Germinación de semillas con acetato de cobre (II) monohidratado

La germinación de las semillas de frijol resultó con índices de toxicidad diferentes para las diversas concentraciones que se sometieron, en el caso de 0 ppm y 10 ppm, indicaron una baja toxicidad, mientras que, para 1, 100 y 1000 ppm su toxicidad es moderada. Los resultados del crecimiento se observan en la Tabla 1.

Por otro lado, se analizaron estadísticamente los datos, véase Figura 1. Se muestran los resultados de un análisis estadístico ANOVA por el método Tukey. Podemos observar que el tratamiento a 10 ppm y 100 ppm son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), sin embargo, los tratamientos a 0 ppm, 1 ppm y 1000 ppm son estadísticamente iguales entre todos ellos, además son estadísticamente iguales al tratamiento control ( $p > 0.05$ ). Estos cambios pueden deberse a que, en bajas concentraciones, el cobre es requerido como nutriente, y tiende a causar efectos tóxicos en altas concentraciones. Aunque en este experimento, no se observaron efectos fitotóxicos significativos hasta 1000 ppm de Cu (II).

**Tabla 1.** Cálculos de fitotoxicidad representada por las diferentes concentraciones de Cu(II) como acetato de cobre (II) monohidratado.

	Porcentaje Germinación muestra	Porcentaje Germinación (control)	Germinación de las semillas	Elongación muestra	Elongación control	Alargamiento de la raíz
<b>0 ppm</b>	97.50%	72.50%	34.48%	42.8	55.2	-0.2
<b>1 ppm</b>	32.50%	72.50%	-55.17%	28.3	55.2	-0.5
<b>10 ppm</b>	100%	72.50%	37.93%	50.6	55.2	-0.1
<b>100 ppm</b>	7.50%	72.50%	-89.66%	33.4	55.2	-0.4
<b>1000 ppm</b>	52.50%	72.50%	-27.59%	35.7	55.2	-0.4



**Figura 1.** En la gráfica se observa el crecimiento de las radículas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) en presencia de diferentes concentraciones de cobre (II) (usando acetato de cobre (II) monohidratado como fuente de cobre). Las barras indican el crecimiento promedio de las radículas. Las barras de error muestran el error estándar, n=4. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

### Germinación de semillas con partículas finas (150 nm) de cobre II (como CuO)

El crecimiento de las semillas de frijol tratadas con partículas finas de cobre (150 nm) se vió significativamente afectada en comparación con el blanco, en los tres tratamientos, según el índice de toxicidad impuesto por Bagur y colaboradores (1996) se observa una alta toxicidad (-0.5 a -0.75). Según Rizwana y col. (2016), numerosos estudios han demostrado que las nanopartículas metálicas afectan el crecimiento, rendimiento y calidad de las plantas en el ámbito agrícola ya que alteran su nutrición mineral, su fotosíntesis y en casos, provocan estrés oxidativo induciendo genotoxicidad en dichos cultivos.

Además, se observó un incremento en el crecimiento de las radículas de las semillas de frijol tratadas con CuO a una concentración de 1 ppm, véase Figura 2, tanto para la radícula como para el tallo, y esto se debe a que, en pequeñas concentraciones, las nanopartículas de cobre pueden fungir como micronutrientes fomentando el incremento de la germinación de semillas (Wang y col. 2015).

Al igual que con el acetato de cobre, los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA y método *Post hoc* de Tukey. En este caso se analizaron tanto la radícula como el hipocótilo (tallo), en el primer caso, podemos observar en la gráfica 2.A que las medias son estadísticamente diferentes, ya que el nivel de significancia es de 0.031, por lo cual se rechaza la hipótesis nula. Por el contrario, la gráfica 2.B referente a la medición del hipocótilo, nos muestra que las medias son estadísticamente iguales, en este caso se aceptó la hipótesis nula ya que el valor del nivel de significancia fue mayor que 0.05 ( $p=0.339$ ).

Tabla 2. Cálculos de fitotoxicidad representada por concentración de CuO (partículas finas de 150 nm).

	Porcentaje Germinación muestra	Porcentaje Germinación (control)	Germinación de las semillas	Elongación muestra	Elongación control	Alargamiento de la raíz
0 ppm	6.67%	72.50%	-90.80%	14.1	55.2	-0.7
1 ppm	56.67%	72.50%	-21.83%	27.2	55.2	-0.5
10 ppm	70%	72.50%	-3.45%	15.5	55.2	-0.7

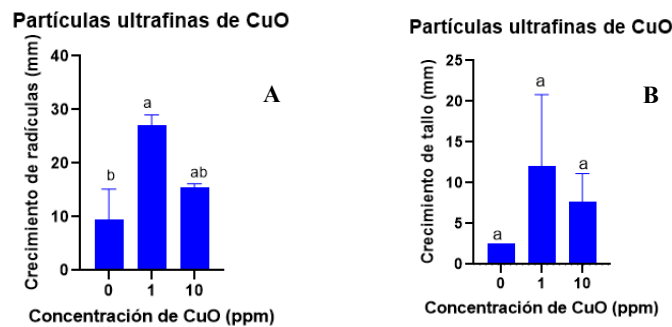


Figura 2. A) Gráfico de las mediciones de radícula de la germinación de semillas de frijol negro a diferentes concentraciones de partículas finas (150 nm) de cobre (II) como CuO. B) Gráfico de las mediciones del tallo de la germinación de semillas de frijol negro a diferentes concentraciones de partículas finas (150 nm) de cobre (II) como CuO. Las barras indican el crecimiento promedio de las radículas. Las barras de error muestran el error estándar, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## Conclusiones

De acuerdo con el índice de toxicidad de Bagur *et al.* (1996), se encontraron índices de toxicidad de baja a moderada para el Cu (II) cuando se utiliza en su forma de acetato de cobre (II) monohidratado. También se observa que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de 1, 10, 100 y 1000 ppm con respecto al tratamiento control. Esto puede deberse a que el cobre es considerado como un nutriente esencial en las plantas y, por otro lado, al no notarse una tendencia, se propone realizar otro experimento en donde se tenga más control en cambios como temperatura y humedad, así como en la preparación de la solución nutritiva de Hoagland.

Las partículas ultrafinas de cobre resultaron altamente fitotóxicas según el índice de toxicidad de Bagur y col (1996), sin embargo, esto contrasta con los análisis estadísticos realizados en radículas e hipocótilos. En la radícula se observa un efecto hormético a la concentración de 1 ppm de Cu (aumento de la raíz significativa con respecto al control,  $p < 0.05$ ), y con respecto a los hipocótilos no se observa este efecto, siendo en todas las concentraciones estadísticamente igual. Esto nos indica que no existe una fitotoxicidad evidente de las partículas finas de cobre (II) con respecto al control.

Por otro lado, se observa que los crecimientos promedios en las raíces de Cu en su forma de acetato son mayores a los observados en el Cu en su forma de partícula fina como CuO, esto puede indicar cierta toxicidad del Cu (II) en su forma de partícula fina de Cu (II) en comparación con su forma de acetato de Cu (II).

## Agradecimientos

Al CONACyT por el apoyo brindado al proyecto de infraestructura Convenio 255270. A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por las becas proporcionadas para la realización de la estancia del Verano de la Ciencia 2022. Al Laboratorio de Evaluación Toxicológica y Riesgo Ambientales (LETRA) por las facilidades otorgadas y a la Q.F.B. Claudia Karina Sánchez Sánchez. También se agradece la participación de la Dra. Liss Lérica Flores Villavicencio del Departamento de Biología y del Dr. Juan Luis Pichardo Molina del Centro de Investigaciones en Óptica A.C. por facilitarnos las partículas finas de CuO para realizar este estudio.

## Referencias

- Andreotti F, Mucha AP, Caetano C, Rodrigues P, Rocha Gomes C, Almeida CM. Interactions between salt marsh plants and Cu nanoparticles - Effects on metal uptake and phytoremediation processes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015 Oct;120:303-9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.06.017. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26094036.
- Anjum NA, Adam V, Kizek R, Duarte AC, Pereira E, Iqbal M, Lukatkin AS, Ahmad I. Nanoscale copper in the soil-plant system - toxicity and underlying potential mechanisms. *Environ Res.* 2015 Apr;138:306-25. doi: 10.1016/j.envres.2015.02.019. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25749126.
- Barrena R, Casals E, Colón J, Font X, Sánchez A, Puentes V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere.* 2009 May;75(7):850-7. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.078. Epub 2009 Mar 4. PMID: 19264345.
- Dietz KJ, Herth S. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci.* 2011 Nov;16(11):582-9. doi: 10.1016/j.tplants.2011.08.003. Epub 2011 Sep 7. Erratum in: *Trends Plant Sci.* 2012 Mar;17(3):180. PMID: 21906987.
- Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Calabrese EJ. Hormetic dose-responses in nanotechnology studies. *Sci Total Environ.* 2014 Jul 15;487:361-74. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.023. Epub 2014 May 3. PMID: 24793332.
- Peng C, Duan D, Xu C, Chen Y, Sun L, Zhang H, Yuan X, Zheng L, Yang Y, Yang J, Zhen X, Chen Y, Shi J. Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environ Pollut.* 2015 Feb;197:99-107. doi: 10.1016/j.envpol.2014.12.008. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25521412.
- Rizwana, M., A. Shafaqat, M. Farooq Qayyumb, Y. Sik Okc, M. Adrees, M. Ibrahima, M. Zia-ur-Rehmand, M. Faride, F. Abbas. (2016). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *Journal of Hazardous Materials.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.061>
- Van NL, Ma C, Shang J, Rui Y, Liu S, Xing B. Effects of CuO nanoparticles on insecticidal activity and phytotoxicity in conventional and transgenic cotton. *Chemosphere.* 2016 Feb;144:661-70. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.028. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26408972.
- Wang, S., H. Liu, Y. Zhang, H. Xin. (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.