



Saltillo, Coahuila a 7 de octubre de 2020

Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

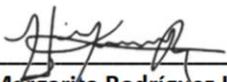
Coordinación de Posgrado

PRESENTE

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **ANGÉLICA CARDIEL ALANÍS** titulado "Respuestas fisiológicas y bioquímicas de *Cucurbita pepo* asociadas al efecto de nanopartículas de óxido de cobre y grafeno" el cual fue presentado el día 2 de octubre de 2020, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

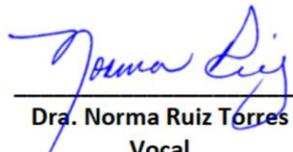
SINODALES



Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Presidente



Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Secretario



Dra. Norma Ruiz Torres
Vocal



Dra. Ileana Vera Reyes

Vo. Bo. de los Asesores



Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar



TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

AUTOR: ANGÉLICA CARDIEL ALANÍS

FIRMA



TITULO: Respuestas fisiológicas y bioquímicas de Cucurbita pepo asociadas al efecto de nanopartículas de óxido de cobre y grafeno.

ASESORES: Dra. Ileana Vera Reyes

FIRMA



Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar

FIRMA



El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 2 de Octubre de 2020

Sello de la Institución



Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

Respuestas fisiológicas y bioquímicas de Cucurbita pepo asociadas al efecto de nanopartículas de óxido de cobre y grafeno

Presentada por:

ANGÉLICA CARDIEL ALANÍS

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Agroplasticultura

Asesorada por:

Dra. Ileana Vera Reyes
Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar

SINODALES



Dr. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Presidente



Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Secretario



Dra. Norma Ruiz Torres
Vocal



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

Respuestas fisiológicas y bioquímicas de *Cucurbita pepo* asociadas al efecto de nanopartículas de óxido de cobre y grafeno

Presentada por:

ANGÉLICA CARDIEL ALANÍS

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Agroplasticultura

Asesorada por:

Dra. Ileana Vera Reyes
Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Ciudad de México a 02 de octubre de 2020



ANGÉLICA CARDIEL ALANÍS

Nombre y Firma

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN AGROPLASTICULTURA

TESIS

**Respuestas fisiológicas y bioquímicas de *Cucurbita pepo*
asociadas al efecto de nanopartículas de óxido de cobre
y grafeno**

P R E S E N T A

Angélica Cardiel Alanís

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

Saltillo, Coahuila, 2020.

Agradecimientos

Al honorable CONACYT por otorgarme el beneficio de ser becaria de la convocatoria “beca nacional 2016”, así como de la convocatoria “movilidad (nacional) 2018” -CVU: 778328-; que me permitieron incorporar un gran bagaje de conocimiento científico, tecnológico, profesional y cultural a mi formación personal y académica.

A mi segunda Alma Máter, el Centro de Investigación en Química Aplicada por toda su generosidad, procuración y atención hacia mis inquietudes científicas, académicas y profesionales, las que me permitieron pulir mi sentido creativo, analítico y crítico en favor de mi formación como investigadora científica sensible y responsable ante las necesidades tecnológicas de nuestro país y el resto del mundo. Destacando a la vez, que una gran institución como el CIQA no se soporta sola, y en ese sentido quiero extender un profundo agradecimiento hacia grandes intelectuales dentro del Departamento de Plásticos en la Agricultura que soportan esta honorable institución; empezando con usted Dr. Hugo Lira por su atención y apoyo incondicional con respecto al desarrollo de mi perfil como investigadora proactiva; que con su valiente personalidad y leal congruencia me dejó grandes y valiosas lecciones que llevaré conmigo el resto de mi vida. Y por su generoso apoyo por el financiamiento de la presente investigación derivado del proyecto fronteras de la Ciencia (convocatoria Fronteras de la Ciencia- proyecto 268).

Permítame también agradecerle Dr. Antonio Cárdenas por su apoyo en la concreción de esta importante meta personal y por ofrecer de manera tan espléndida sus conocimientos y sembrar en cada uno de sus alumnos ese impulso analítico-crítico en favor de una evolución del pensamiento, factor que lejos de acaparar solo para mí, he de compartir con aquellos dispuestos y no dispuestos para continuar esa sinergia magnífica en favor del mejoramiento de nuestro rol como futuros científicos que impacten y contribuyan positivamente a una mejora social.

Dra. Ileana Vera por las lecciones de responsabilidad brindadas, el trabajar con usted fue de mucho aprendizaje.

Por otro lado, extiendo mi sincero agradecimiento a la Dra. Norma Ruíz por la amabilidad de recibirme en su prestigiosa institución (UAAAN) y mostrarme técnicas fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Finalmente me permito agradecerles a 3 grandes mujeres de la dinastía Gómez Valdés a quienes quiero, admiro y respeto profundamente. Gracias por adoptarme como un miembro más de su increíble familia y brindarme todo su apoyo y confianza. Mis mejores deseos para vosotras y mi eterno agradecimiento.

Resumen

En este trabajo de investigación se analizó mediante dos bioensayos en cámaras de crecimiento, las respuestas fisiológicas y bioquímicas en plantas de *Cucurbita pepo* L. (Zucchini) durante 2 momentos diferentes, asociados a los cambios en crecimiento y desarrollo, así como al estallamiento oxidativo, inducidos por los tratamientos aplicados de dos nanomateriales (NMs), uno derivado del carbono (grafeno) y otro de naturaleza metálica (NPs CuO).

En el primer bioensayo (con semillas sembradas entre papel Anchor), el estímulo generado por ambos NMs impactó de manera positiva el vigor de las plántulas; en el caso del grafeno, se observó una tendencia de incremento en el vigor bajo la concentración de 50 mg L⁻¹, y en el caso del bioensayo con NPs CuO, el resultado más significativo se obtuvo con 25 mg L⁻¹ de NPs CuO. Se observaron en ambos tipos de NMs alteraciones morfológicas en la raíz, a partir de dosis de 1000 mg L⁻¹ de grafeno y de 250 mg L⁻¹ de NPs CuO.

El grafeno promovió mayor crecimiento y densidad de pelos radiculares (1000 mg L⁻¹); fenómenos relacionados con el incremento regulado de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el tejido, y una mayor acumulación de compuestos fenólicos. Mediante un análisis proteómico diferencial se consignó que las plántulas de *C. pepo*, tuvieron un incremento en la expresión de proteínas relacionadas con alteraciones en la pared celular, rutas de regulación redox, señalización bioquímica, transporte de agua en las membranas y el incremento del estado energético de las células; siendo todas estas respuestas fisiológicas un factor clave para inducir un incremento en el crecimiento, la producción de biomasa y en la densidad de pelos absorbentes. Mientras que las NPs CuO a una dosis de 250 mg L⁻¹, provocaron una inhibición significativa en el desarrollo de la raíz principal. El perfil proteómico exhibió que 92 ± 21 manchas fueron exclusivas para el tratamiento con 250 mg L⁻¹ NPs CuO (p < 0.05).

En el segundo bioensayo realizado en sustrato hasta los 25 días después de la emergencia de las plántulas, se evaluó la dosis de 1000 mg L⁻¹ de grafeno, la cual provocó un incremento significativo en 7 de las 8 variables analizadas: altura de raíz y tallo, diámetro de tallo, biomasa de raíz, vástago e índice relativo de crecimiento; variables relacionadas con la morfo-fisiología de *C. pepo* asociadas con el estallamiento oxidativo inducido por este NM. Para el caso de las NPs CuO se realizó la evaluación paralela de dos dosis 25 y de 250 mg L⁻¹, observándose en esta última, una mitigación del efecto fitotóxico registrado en las pruebas preliminares (germinación), al no encontrarse plantas con malformaciones morfológicas y una respuesta fisiológica y bioquímica estadísticamente similar (N.S.) en la mayoría de los casos, en comparación la concentración de 25 mg L⁻¹ y el tratamiento control.

Abstract

In this research work were evaluated and analyzed by two bioassays in growth chambers, the physiological and biochemical responses in *Cucurbita pepo* L. (Zucchini) plants, at two different times, associated with changes in growth and development, as well as the oxidative burst, induced by the applied treatments of two nanomaterials (NMs), one derived from carbon (graphene) and another of a metallic nature (NPs CuO).

In the first bioassay (with seeds sown between Anchor paper), the stimulus generated by both NMs positively impacted the seedlings vigor in doses of 50 mg L⁻¹ of graphene, and significant differences were detected with 25 mg L⁻¹ of NPs CuO. The morphological alteration in the root was observed from the doses of 1000 and 250 mg L⁻¹ of graphene and CuO NPs, respectively. Regarding to secondary metabolism, graphene promoted greater growth and density of root hairs; phenomena related to the regulated increase of reactive oxygen species (ROS) in the tissue, and a greater synthesis of phenolic compounds. The differential proteomic analysis technique indicated that *C. pepo* seedlings had an increase in the expression of proteins related to alterations in the cell wall, redox regulation pathways, biochemical signaling, water transport in the membranes and the increase of the cell's energy state. All these physiological responses being a key factor in inducing an increase in growth, biomass production and on density of absorbent hairs.

At morphological level, alterations were detected in the radicles of plants whose seeds were treated with 250 mg L⁻¹ of CuO NPs. The most prominent effect 8 days after germination, was a significant inhibition in the development of the main root, and a lower concentration of phenolic compounds could be seen. At the proteomic level, of the 697 ± 48 protein spots found in common in both treatments, 92 ± 21 were exclusive for the treatment with 250 mg L⁻¹ CuO NPs (p < 0.05).

During the second bioassay carried out in substrate until 25 days after the emergence of the seedlings, the graphene dose of 1000 mg L⁻¹ caused a significant increase in 7 of the 8 variables analyzed: root and stem length, stem diameter, root and stem biomass and relative growth rate; variables related to the morph physiology of *C. pepo* associated with the oxidative burst induced by this NM. In the case of CuO NPs, with the dose of 250 mg L⁻¹, an important mitigation in the phytotoxic effect was observed in the preliminary tests, since no plants with morphological malformations were observed, and with statistically similar (N.S.) physiological and biochemical response, in most cases, compared to the lower concentration (25 mg L⁻¹) and the control treatment.

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1	LA NANOTECNOLOGÍA.....	3
2.2	CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES	3
2.3	APLICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES EN LA AGRICULTURA.....	4
2.4	NANOMATERIALES DE CARBONO.....	4
2.5	EFECTO DEL GRAFENO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS	6
2.6	NANOMATERIALES METÁLICOS: NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE	8
2.7	INTERACCIÓN DE LOS NANOMATERIALES CON LOS SISTEMAS VEGETALES.....	12
2.8	ESTRÉS OXIDATIVO	14
2.8.1	<i>Respuesta antioxidante</i>	15
2.9	TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LOS NANOMATERIALES EN SISTEMAS VEGETALES DE INTERÉS AGRÍCOLA ..	15
3.	HIPÓTESIS.	18
4.	OBJETIVO GENERAL	18
4.1.1	<i>Objetivos particulares</i>	18
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1	PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE GRAFENO Y NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE.....	19
5.2	PRUEBA DE GERMINACIÓN ESTÁNDAR - ISTA	20
5.3	PRUEBAS ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO	22
5.3.1	<i>Determinación cualitativa y cuantitativa de peróxido de hidrógeno</i>	22
5.3.2	<i>Determinación de fenoles totales</i>	23
5.3.3	<i>Cuantificación de prolina</i>	23
5.3.4	<i>Cuantificación de clorofila a, b y total</i>	24
5.3.5	<i>Actividad enzimática antioxidante</i>	24
5.3.5.1	Actividad de Superóxido Dismutasas (SOD)	25
5.3.5.2	Actividad de Peroxidasas (POX)	25
5.3.5.3	Actividad de Ascorbato Peroxidasas (APX).....	25
5.3.5.4	Actividad de catalasas (CAT).....	26
5.3.5.5	Determinación del contenido de proteína por el método Bradford	26
5.3.6	<i>Proteómica diferencial</i>	26
5.3.7	<i>Extracción de proteína</i>	26
5.3.8	<i>Rehidratación y cuantificación de proteína</i>	27
5.3.9	<i>Electroforesis cualitativa</i>	27
5.3.10	<i>Isoelectroenfoque</i>	27
5.3.11	<i>Electroforesis 2-D</i>	28
5.3.12	<i>Análisis proteómico diferencial</i>	29
5.4	BIOENSAYO DE SIEMBRA EN SUSTRATO	30
5.4.1	<i>Parámetros morfo-fisiológicos</i>	31
5.4.2	<i>Diseño experimental y Análisis estadístico</i>	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1	RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE <i>CUCURBITA PEPO</i> ASOCIADAS AL EFECTO DEL GRAFENO	33
6.1.1	<i>Ensayos de germinación estándar</i>	33
6.1.1.1	Transporte de agua y solutos a través de la membrana	50
6.1.1.2	Modificación de la pared celular	50
6.1.1.3	Proceso de óxido reducción y señalización	51

6.1.1.4	Proteínas relacionadas con el metabolismo de energía y carbohidratos.....	53
6.1.1.5	Síntesis/ preservación y degradación de proteínas.....	54
6.1.2	<i>Bioensayo de siembra en sustrato: Parámetros morfo-fisiológicos.....</i>	54
6.1.3	<i>Pruebas bioquímicas sobre el estado de estrés oxidativo.</i>	55
6.2	RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE <i>CUCURBITA PEPO</i> ASOCIADAS AL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE.....	64
6.2.1	<i>Ensayos de germinación estándar - ISTA</i>	64
6.2.2	<i>Eventos bioquímicos y fisiológicos asociados a la aplicación de nanopartículas de óxido de cobre.</i>	67
6.2.3	<i>Proteómica diferencial.....</i>	70
6.2.4	<i>Bioensayo de siembra en sustrato: parámetros morfofisiológicos.....</i>	71
6.2.5	<i>Bioensayo de siembra en sustrato: Pruebas bioquímicas sobre el estado de estrés oxidativo</i>	72
7.	CONCLUSIONES.....	78
8.	PERSPECTIVAS	79
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	80
10.	ANEXO	93

Índice de Figuras

Figura 1. Escala de conversión nano-micrométrica.	3
Figura 2. Estructura molecular del grafeno.	5
Figura 3. Alótopos del grafeno.	6
Figura 4. Curva característica de la relación estrés vs. rendimiento agrícola.....	14
Figura 5. Espectroscopía Raman del grafeno.....	19
Figura 6. Micrografías de las nanopartículas de óxido de cobre.	20
Figura 7. Semillas de <i>Cucurbita pepo</i> imbibidas en las diferentes suspensiones de grafeno.....	33
Figura 8. Comparación de las raíces de plántulas <i>Cucurbita pepo</i>	34
Figura 9. Depósitos de peróxido de hidrógeno en raíces de <i>Cucurbita pepo</i>	38
Figura 10. Perfil proteico de extractos de raíz de <i>Cucurbita pepo</i>	40
Figura 11. Perfil proteómico en dos dimensiones de raíces de <i>Cucurbita pepo</i>	41
Figura 12. Perfil proteómico diferencial de raíces de <i>Cucurbita pepo</i>	42
Figura 13. Diagrama de Venn de las proteínas expresadas en raíces de <i>Cucurbita pepo</i> bajo estrés con grafeno.....	43
Figura 14. Raíces de plántulas de <i>Cucurbita pepo</i> bajo tratamiento con soluciones de nanopartículas de óxido de cobre.	65
Figura 15. Tinción con diaminobencidina en raíces de <i>Cucurbita pepo</i> tratadas con nanopartículas de óxido de cobre..	69
Figura 16. Diagrama de Venn de las proteínas expresadas en raíces de <i>Cucurbita pepo</i> bajo estrés con nanopartículas óxido de cobre.	71

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Efecto de nanopartículas de óxido de cobre en plantas de importancia agrícolas.	9
Cuadro 2. Respuestas morfológicas de plántulas de <i>Cucurbita pepo</i> cuya semilla fue imbibida en suspensiones de grafeno a diferentes concentraciones.	36
Cuadro 3. Proteínas identificadas de las raíces de <i>Cucurbita pepo</i> bajo estrés por grafeno.	44
Cuadro 4. Respuesta morfológica observada en plantas de <i>Cucurbita pepo</i> tratadas con grafeno (Veinticinco días después de la emergencia de la plántula).	55
Cuadro 5. Concentración de peróxido de hidrógeno intracelular radicular de plantas de <i>Cucurbita pepo</i> ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$).	56
Cuadro 6. Actividad específica de Peroxidasas, Ascorbato peroxidasas y Catalasas en raíces de <i>C. pepo</i> bajo tratamiento con grafeno.	58
Cuadro 7. Contenido de prolina en raíces de <i>Cucurbita pepo</i> tras la aplicación de grafeno ($\mu\text{mol/g de tejido}$).	60
Cuadro 8. Contenido de clorofila en las plantas de <i>Cucurbita pepo</i> bajo tratamiento con grafeno.	63
Cuadro 9. Respuestas morfológicas de plántulas de <i>Cucurbita pepo</i> tratadas con nanopartículas de óxido de cobre.	66
Cuadro 10. Concentración de peróxido de hidrógeno intracelular ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$) en raíces de plantas de <i>Cucurbita pepo</i> bajo estrés por nanopartículas de óxido de cobre.	68
Cuadro 11. Contenido de fenoles totales ($\mu\text{g de catequina /gPS}$) presentes en las raíces de <i>Cucurbita pepo</i> bajo tratamiento con nanopartículas de óxido de cobre.	69
Cuadro 12. Respuestas morfológicas de plantas de <i>Cucurbita pepo</i> bajo la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.	72
Cuadro 13. Concentración de peróxido de hidrógeno ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$) en las raíces de plantas de <i>Cucurbita pepo</i> tras la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.	73
Cuadro 14. Actividad específica de Peroxidasas, Ascorbato peroxidasas, Catalasa y Superóxido dismutasa tras la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre a plantas de <i>Cucurbita pepo</i>	74
Cuadro 15. Contenido de prolina (μg) en raíces de <i>Cucurbita pepo</i> tras la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.	75
Cuadro 16. Contenido de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y total de plantas de <i>Cucurbita pepo</i> después de la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.	76

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico.
AIA: Ácido indolacético.
AG: Ácido giberélico.
APX: Ascorbato peroxidasa.
ATP: Adenosin trifosfato.
BSA: Suero de albúmina bovino.
CAT: Catalasa.
CB: Contenido de biomasa (mg).
DAB: Diaminobencidina (214.27 g / mol).
DTT: Ditioneitol (154.25g / mol).
dde.: días después de la emergencia de la plántula.
dds.: días después de la siembra.
EDTA: Ácido etilendiaminotetra-acético (292.24 g / mol).
ERO: Especies reactivas de oxígeno.
GC: Germinación del lote control.
GT: Germinación del lote tratado con NMs.
% G: Porcentaje de germinación.
IG: Índice de germinación.
IEF: Isoelectroenfoque.
IRC: Índice relativo de clorofila.
ISTA: Asociación Internacional de Evaluación de Semillas.
kD: kilodaltons.
LP: Longitud de plúmula.
LR: Longitud de radícula.
NMs: Nanomateriales.
NPs: Nanopartículas.
NPs Cu: Nanopartículas de cobre.
NPs CuO: Nanopartículas de óxido de cobre.
NPA: Número de plántulas anormales.
NT: Nanotecnología.
NTC: Nanotubos de carbono.
NTCM: Nanotubos de carbono multipared.
OG: Óxido de grafeno.
PA: Porcentaje de plántulas anormales.
PF: Peso fresco (mg).
POX: Peroxidasa.
PS: Peso seco (mg).
PVP: Polivinilpirrolidona.
Redox: Proceso de óxido reducción.
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SG: Número de semillas germinadas.
SOD: Superóxido dismutasa.
TCA: Ácido tricloroacético.
TS: Número total de semillas.

1. Introducción

La producción alimentaria requiere desarrollar e implementar tecnologías innovadoras y sustentables que permitan satisfacer la demanda creciente de alimento, ya que se requerirá incrementar al menos en un 50 % los rendimientos agrícolas dentro de los siguientes 30 años (FAO, 2017). El uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos (AQS; fertilizantes y plaguicidas), ha sido una práctica común desde la década de 1950 para incrementar el rendimiento en la producción de alimentos. Actualmente el alto costo de los AQS y su impacto negativo sobre los diferentes ecosistemas, generan un replanteamiento sobre la integración tecnológica para reducir el efecto negativo sobre los 3 recursos naturales más importantes para la agricultura: suelo, agua y atmósfera (IPCC, 2014). La condición alterada de los agroecosistemas les ha convertido en dependientes de la provisión de energía externa (fertilizantes, plaguicidas, etc.), en caso de suspender esta provisión, el equilibrio que favorece una tasa de producción agrícola aceptable se rompe, reduciendo la biodisponibilidad de nutrientes, y en consecuencia su asimilación, llevando al sistema completo a un estado crítico, que resulta en pérdidas productivas. Por ello, es importante integrar formas más eficientes de aprovechamiento de los insumos, como pueden ser los nanomateriales (NMs) utilizados como fertilizantes y plaguicidas (Zita, 2013; Chhipa, 2017; Van Emden *et al.*, 2017).

Los NMs surgen como un avance tecnológico, que puede transformar y mejorar la agricultura contribuyendo a la adaptación de las diferentes especies agrícolas a entornos de producción no ideales y, lograr una fertilización o control fitosanitario adecuados en los cultivos con menor cantidad de producto empleado, al cambiar el tamaño de la estructura componente del ingrediente activo es posible reducir las dosis de aplicación dada la incrementada proporción de producto absorbido con relación al producto residual, definido como aquel que queda depositado en sitios u organismos no objetivos (Lira *et al.*, 2016; Raliya *et al.*, 2018).

Con el aprovechamiento de la Nanotecnología (NT) en la agricultura es posible desarrollar nanofertilizantes, nanopesticidas, nanoherbicidas y nanosensores (Lira *et al.*, 2018). Sin embargo, previo a la validación comercial de esta tecnología es necesario conocer y proyectar las condiciones de interacción de estos NMs con los sistemas vegetales para prevenir algún efecto adverso en los ecosistemas. Para ello, se han propuesto métodos demostrativos que, hasta el momento, la gran mayoría dejan de lado la dinámica metabólica de las plantas y los ajustes que tuvieron lugar dentro de las diferentes rutas bioquímicas para lograr su adaptación ante la interacción con los NMs (Dimkpa *et al.*, 2012). Siendo esta la razón, de búsqueda hacia otros métodos que brinden explicaciones más específicas, con apego a una perspectiva integral.

La presente investigación se abordó desde un enfoque fisiológico, bioquímico y proteómico que permitió vislumbrar y explicar la interacción de la planta con dos NMs de diferente naturaleza; uno derivado del carbono (grafeno) y otro de origen metálico (NPs CuO). La explicación resultante fue concebida bajo una perspectiva de estímulo-respuesta, diferenciada por el grado de estrés vinculado al incremento de H₂O₂ intracelular (ERO) y a la capacidad antioxidante (enzimática y no enzimática) ante la presencia de los NMs en el sistema; complementándose de manera paralela con la descripción de las principales rutas metabólicas percibidas mediante patrones proteómicos diferenciales y reflejadas en cambios morfofisiológicos en los diferentes órganos de las plantas de *Cucurbita pepo* var. Zucchini. Esto con el propósito de comprender los potenciales mecanismos de activación sobre los que actúan estos NMs en plantas de importancia económica como la calabacita, sirviendo de referencia para una futura búsqueda hacia una explicación concreta e integral sobre la relación NMs-estímulo/estrés oxidativo y cambios morfo-fisiológicos asociados.

2. Antecedentes

2.1 La nanotecnología

La NT es una ciencia interdisciplinaria que tiene como principal característica el empleo de objetos a escala nanométrica como las NPs; éstas son estructuras comprendidas en una dimensión de 10^{-9} m en al menos una de sus dimensiones conformacionales (x, y o z) (Zhang *et al.*, 2016). La dinámica que confiere la escala nanométrica a los materiales en general, es diferente en comparación a la que se puede percibir en aquellos bajo una escala micrométrica (10^{-6}) o macrométrica ($> 10^{-3}$), debido a la alteración de sus propiedades físico-químicas, como el incremento en su área superficial y un efecto a nivel cuántico, que por un confinamiento electrónico, da lugar a una mayor reactividad; esto visto desde un punto de eficiencia, permite emplear una menor cantidad de reactivo para provocar efectos similares en comparación con el compuesto de tamaño micro o macromolecular (Figura 1). De esta manera los NMs se constituyen como unidades que vinculan 2 tipos de comportamiento, uno que obedece a patrones atómicos y otro a patrones moleculares (Nasir *et al.*, 2015).

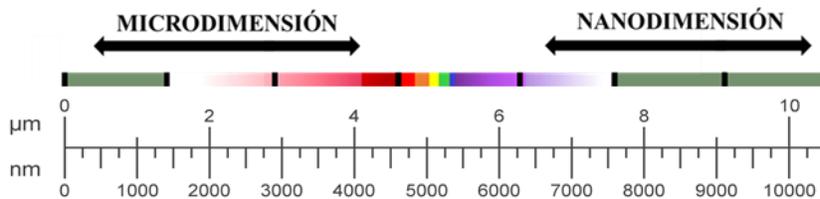


Figura 1. Escala de conversión nano-micrométrica.
(Adaptada de Nasir *et al.*, 2015).

2.2 Clasificación de los nanomateriales

Ésta se basa en el número de dimensiones conformacionales (x, y, z) que se encuentran por encima de los 100 nm; por ejemplo, las partículas cero-dimensionales, son aquellas donde los 3 planos o dimensiones son menores a 100 nm; en los unidimensionales, uno de sus planos (x, y o z) excede los 100 nm; los bidimensionales van a superar los 100 nm en dos de sus planos y los tridimensionales son aquellos en los cuales, los 3 planos componentes de la estructura se encuentren por encima de 100 nm, pero dan lugar a la formación de nanoespacios como en el caso de la zeolita (Rao *et al.*, 2012). Otra clasificación depende de su origen, en ésta se reconocen 3 tipos: naturales, incidentales y de ingeniería (Kole *et al.*, 2016). En este

último grupo se pueden distinguir 2 categorías: orgánicas e inorgánicas, como NPs orgánicas se encuentran las lipídicas, biopoliméricas y de carbono (grafeno, nanotubos de carbono, fulerenos, etc.); constituyendo el segundo grupo se encuentran las partículas metálicas, no metálicas y semiconductoras (Bao, 2013; Gregorczyk *et al.*, 2016). Para la obtención de estas NPs, en el caso de las orgánicas se pueden emplear métodos, como: polimerización por emulsión, precipitación o secado; si el tipo de NPs a obtener es de naturaleza inorgánica, entonces se puede emplear el método: “top down” o “bottom-up”, donde el primero está basado en la reducción de tamaño de las partículas por trituración con la aplicación de energía mecánica, mientras que el segundo, da lugar a la formación de NPs de síntesis a partir de sus unidades conformacionales y puede tener lugar dentro de una fase de vaporización o una líquida (Wijesena *et al.*, 2015).

2.3 Aplicación de los nanomateriales en la agricultura

La búsqueda permanente sobre mejorar el aprovechamiento energético de los insumos dentro de los agroecosistemas mediante el incremento de su eficiencia, brinda una gran oportunidad para implementar la NT en el sector agrícola, mediante su modificación estructural, reduciendo su tamaño y brindando una mayor capacidad de reacción dentro de las unidades biológicas, que en este caso son las células y tejidos vegetales (Lira-Saldívar *et al.*, 2018; Karn *et al.*, 2018), haciendo factible una mejor adaptación a entornos de condiciones no ideales, mediante la aplicación de nanoestimulantes (NMs derivados del carbono) o bien los nanofertilizantes (NPs metálicas) (Liu, 2015; Chhipa, 2017).

2.4 Nanomateriales de carbono

El interés del estudio sobre los NMs derivados del carbono y en especial del grafeno en plantas agrícolas, surge debido a la trascendencia ecológica de la deposición final de este NM al utilizarse a gran escala en la fabricación de dispositivos electrónicos de uso experimental, industrial y doméstico; encontrándose un potencial efecto como promotor del crecimiento en especies vegetales (He *et al.*, 2018).

El grafeno es un alótropo de segundo orden, derivado del grafito, que se forma a partir de la unión de diversos átomos de carbono tras una hibridación especial (Battye *et al.*, 2017). Hay 2 alótropos de primer orden con estructura cristalina (patrón de hibridación exclusivo sp³ o sp²) de este elemento (carbono), el diamante y el grafito; éste último resulta de la superposición de unidades laminares finas de carbono, desplegadas en un patrón hexagonal continuo semejante a un panal (Grafeno; Figura 2), en retrospectiva, si estas láminas se separan entre sí y se aíslan, se obtiene el grafeno (Vajtai, 2013). Por otro lado, si el patrón de hibridación no es homogéneo, se obtendría un alótropo amorfo; el cual tiene un uso común como combustible (fogatas) (Vajtai, 2013).

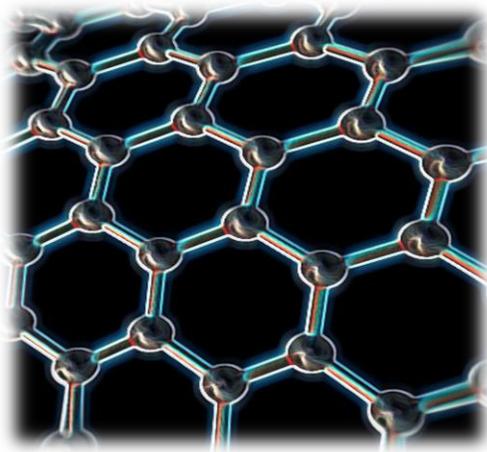


Figura 2. Estructura molecular del grafeno.
Imagen tomada de Google (2017).

Dentro de la estructura bidimensional del grafeno (sus planos x/y se encuentran fuera de la escala nanométrica), el alto de la lámina (dimensión z) es la que le admite en la categoría “nano”, que corresponde al ancho de los átomos de carbono (Vajtai, 2013). Su patrón de hibridación sp^2 , permite la formación de pliegues o zonas corrugadas que le pueden dar al grafeno una mayor altura (sin salir de la escala nano) y este fenómeno es lo que le brinda gran estabilidad energética y estructural, ya que fungen como depósitos del exceso de energía, que le permiten tener propiedades particulares, como es su gran área superficial de $2,630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, la formación de una red deslocalizada de electrones, confiriéndole facultades bipolares (capacidad de aceptar y donar electrones en un flujo constante) (Wang, 2011; Freitag, 2015). Al ser un NM inorgánico el grafeno se puede obtener por 3 métodos: 1) Exfoliación mecánica o por sonicación en un solvente (agua o polietilenglicol). 2) Deposición química de vapor, o 3) Por descomposición del carburo de silicio SiC (Vajtai, 2013). El grafeno a su vez, también puede dar lugar a formas alótropas (con el mismo patrón de hibridación sp^2) y diferentes escalas dimensionales; como en la clasificación general, si dicha escala sólo escapa en un plano dimensional el rango nanométrico (1-D), se hablará de nanotubos de carbono (NTC); si ningún plano escapa de la escala nanométrica entonces es posible concebir estructuras como el fullereno (Figura 3) (Vajtai, 2013; Freitag, 2015; Tang *et al.*, 2015).

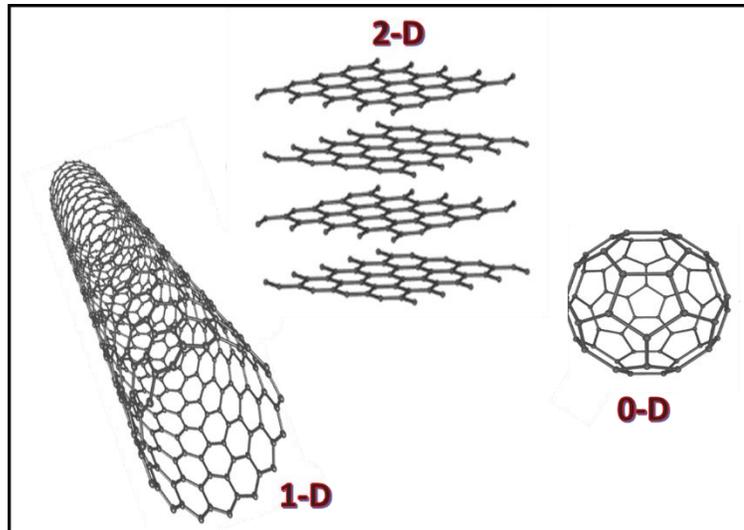


Figura 3. Alótropos del grafeno (Modificada de Hoffmann *et al.*, 2016).
1-D nanotubos de carbono, 2-D láminas de grafeno y 0-D fulerenos.

Algunos resultados sobre la interacción de estos NMs con plantas de interés agrícola, son un efecto promotor de crecimiento, mayor nodulación y actividad nitrogenasa en el sistema *Rhizobium*-leguminosas (Khodakovskaya, 2013; Lahiani *et al.* 2018; Yuan *et al.*, 2017). De los puntos fundamentales para impulsar en una mayor proporción la implementación de esta tecnología, se encuentra el establecer las concentraciones, momentos y vías de aplicación adecuados, en donde los NMs tengan su máximo efecto biológico benéfico y con ello, contribuir a la meta global de cualquier investigación agrícola aplicada, que es el incremento de productividad por unidad de superficie (Kole *et al.*, 2016).

2.5 Efecto del grafeno en la germinación de semillas y crecimiento de las plantas

Zhang *et al.* (2015) analizaron el efecto del grafeno en la germinación de semillas de tomate y encontraron que aquellas tratadas con grafeno germinaron antes que las semillas del tratamiento control; debido a que el grafeno penetró fácilmente la testa de las semillas y se incorporó en los cotiledones, plúmula y radícula; la ruptura de la testa a la entrada del grafeno, facilitó la absorción de agua, detonando con mayor rapidez los procesos consecutivos inherentes a la germinación (imbibición, hidratación enzimática y emergencia de radícula) (Bewley *et al.*, 2013), logrando además de una emergencia prematura, una mayor tasa de germinación (El-Maarouf *et al.*, 2015).

Liu *et al.* (2015) estudiaron los efectos del grafeno sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas de arroz. En las semillas que fueron tratadas con soluciones de grafeno a altas

concentraciones ($> 100 \text{ mg L}^{-1}$), se observó un efecto contrario a lo reportado por Zhang *et al.* (2015), donde la velocidad de germinación se redujo y el crecimiento tanto de la radícula y plúmula resultaron afectados en comparación con las concentraciones menores (5 mg L^{-1}) y el tratamiento control. En cuanto a la morfología de las plántulas se observó una afectación importante en la longitud de la raíz, tallo, raíces adventicias y biomasa en general. Sin embargo, al tratar las semillas con una concentración de 5 mg L^{-1} de grafeno durante 16 días, se observaron efectos positivos sobre el número de raíces adventicias, la biomasa fresca de la raíz y de la parte visible sobre el suelo. Cabe destacar que todas las variables de respuesta propuestas en su investigación mostraron un decremento significativo bajo concentraciones de 100 y 200 mg L^{-1} , indicando que, a concentraciones altas y tiempos prolongados de exposición, el grafeno inhibe la morfogénesis de las plántulas de arroz. Pero el mecanismo por el cual el grafeno en dosis de 5 mg L^{-1} mejora parte de los índices de crecimiento aún necesita más estudio para su completa comprensión.

Por otro lado, el estudio de Anjum *et al.* (2014) reveló que los efectos del óxido de grafeno (OG) en la germinación de *Vicia faba* fueron dependientes de la concentración y que esos resultados fueron tanto positivos como negativos. Los impactos negativos significativos de las concentraciones de OG (ordenados por la magnitud del efecto: $1600 > 200 > 100 \text{ mg L}^{-1}$) correspondieron con disminuciones en el crecimiento y la actividad de las enzimas que descomponen el H_2O_2 (ascorbato peroxidasa, APX; catalasa, CAT), dando lugar a un incremento en su concentración y de manera paralela también a aumentos en los niveles de fuga de electrolitos (EL) y oxidación de lípidos y proteínas. Los impactos positivos de 400 y 800 mg L^{-1} de OG incluyeron mejoras significativas en el balance redox de las plantas *V. faba* indicado por niveles disminuidos de fuga de EL, H_2O_2 y oxidación de lípidos y proteínas, derivado de una mayor actividad enzimática (APX y CAT) y un aumento en el contenido de prolina. En general, los efectos positivos de estas dos concentraciones de OG ($800 > 400 \text{ mg L}^{-1}$) en plántulas de *V. faba* permiten sugerir la necesidad que se realicen estudios adicionales.

Hu y Zhou (2014) reportaron un nuevo y biocompatible grafeno hidratado (HGR), el cual promovió la germinación de semillas envejecidas por dos años. En comparación con grafeno y óxido de grafeno (OG), el HGR aumentó la germinación de semillas en 15 % la diferenciación de raíces entre el 52 y 59 % y mejoró la resistencia al estrés oxidativo. El análisis de metabolómica reveló que el HGR regulaba el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos involucrados en el metabolismo secundario, así como el secuestro de nitrógeno, la integridad de la membrana celular, la permeabilidad y la resistencia a la oxidación.

Estudiando los efectos de los NMs de carbono de diversas dimensiones (nanotubos de carbono, C60 y grafeno) en la germinación de las semillas de arroz, Nair *et al.* (2012) observaron un aumento pronunciado en su tasa de germinación en presencia de nanotubos. También se apreció un mayor contenido de agua en

las semillas tratadas con NMs de carbono durante la germinación en comparación con los controles. Las semillas germinadas se cultivaron en un medio de crecimiento suplementado con NMs de carbono para estudiar su impacto en el crecimiento de las plántulas, evidenciando que las plántulas tratadas fueron más saludables con sistemas de raíces y brotes bien desarrollados en comparación con las plántulas control.

2.6 Nanomateriales metálicos: Nanopartículas de óxido de cobre

Para hacer mención sobre la importancia potencial de estos NMs, hay que considerar la necesidad de cualquier sistema agrícola intensivo, que es mantener un adecuado nivel de nutrición en las plantas, esto se refiere a proveer en las cantidades adecuadas los 16 elementos químicos (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, B, Mo y Cl) que requieren para desarrollar su ciclo vital de manera exitosa y lleven a cabo su metabolismo sin alteraciones fisiológicas que demeriten sus funciones generales, destacando que cada especie va a requerir de estos elementos en diferente proporción (Marschner, 2011). En este sentido, las NPs metálicas tienen un potencial aprovechamiento como fuente de algunos nutrientes metálicos como Cu, Fe y Zn; se han probado hasta la fecha en diferentes especies de grano básico como arroz, maíz, trigo y soya; en hortalizas (lechuga, pepino, rábano, tomate, zanahoria, berenjena, etc.); forrajeras e industriales como alfalfa, trébol y algodón; en otras leguminosas como garbanzo y haba (Du *et al.*, 2017).

El cobre (Cu) es un elemento que por sus propiedades (metálicas) se ubica dentro del bloque D de la tabla periódica, denotando facultades para intervenir fácilmente en reacciones de óxido-reducción (Buchanan *et al.*, 2012). Estas facultades dentro de los sistemas vegetales son aprovechadas, i.e. en las enzimas donde algunos metales como el Cu intervienen como activadores (co-factores; Nelson y Cox, 2004). Este metal en específico (Cu) se encuentra directamente ligado al metabolismo celular, si este elemento está ausente, la planta sería incapaz de completar su ciclo biológico adecuadamente (Marschner, 2011); como ejemplo de su participación específica en el metabolismo vegetal se puede mencionar su función conjunta con la plastocianina, enzima transportadora de electrones que se encarga de oxidar al citocromo F que forma parte del fotosistema I, contribuyendo en una translocación de protones para generar el gradiente de pH necesario, que da lugar a la síntesis de adenosin-trifosfato (ATP) (Marschner, 2011; Buchanan *et al.*, 2012); otro ejemplo se puede encontrar en las mitocondrias, específicamente en el complejo enzimático III que interviene en el proceso de respiración para también obtener energía (ATP) (Buchanan *et al.*, 2012). Si bien el Cu es cofactor en enzimas que sirven para la obtención de ATP, también puede ser cofactor de algunas con funciones antioxidantes como la superóxido-dismutasa (SOD), la cual forma parte del complejo enzimático antioxidante en respuesta a la presencia de ERO, responsables del estrés oxidativo en las células (Buchanan *et al.*, 2012). Por la cantidad que requiere la planta de este elemento, se le considera como un micronutriente, la mayoría de los cultivos de importancia agronómica demandan aproximadamente

6 mg de Cu*kg de biomasa seca⁻¹ (Marschner, 2011), sin embargo, hay que recordar que la demanda puede cambiar dependiendo de la especie y de las condiciones del agroecosistema (Marschner, 2011).

El impulso del cobre en su escala nanométrica en forma de NPs de óxido de cobre (NPs CuO) se debe en gran parte a su abundancia natural, producción de bajo costo, naturaleza no tóxica y buena conductividad eléctrica (Dimkpa *et al.*, 2012). Algunos de los avances experimentales de múltiples bioensayos con este tipo de NPs en especies agrícolas se presentan de manera resumida en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Efecto de nanopartículas de óxido de cobre en plantas de importancia agrícolas.

Concentración (mg L-1)	Especie	Efecto en plantas	Medio de crecimiento	Referencia
1000	Calabaza	Reducción de la longitud de la raíz y en el contenido de biomasa	Solución hidropónica	Stampoulis <i>et al.</i> , 2009
130 y 600	Lechuga	Incrementó el crecimiento de las plantas hasta en 90 %	Arena	Shah, 2009
100 y 500	Calabaza	Redujo el crecimiento promedio de las plantas y su transpiración en 65 %	Suspensión	Kole <i>et al.</i> , 2016
5, 15, 30, 45, 60, 100, 200, 400 y 600	Soya y Garbanzo	Correlación inversa entre la concentración y la elongación radicular	Cajas de Petri	Adhikari <i>et al.</i> , 2012
20 - 500	Rábano Pepino Lechuga	Reducción en la tasa de germinación	Cajas de Petri	Wu <i>et al.</i> , 2012
10 y 100	Maíz	Inhibición de la elongación radicular	Sistema hidropónico	Wang <i>et al.</i> , 2012
500	Trigo	Incremento del contenido de biomasa	Arena	Dimkpa <i>et al.</i> , 2012
50, 500, 2000 y 4000	Trigo sarraceno	Las dos concentraciones más altas disminuyeron la longitud de la raíz, y la de 4000 mg L-1 redujo la biomasa del tallo	Cajas de Petri	Lee <i>et al.</i> , 2013

40, 80 y 120	Arroz	Reducción en la tasa de germinación	Suspensión	Shaw <i>et al.</i> , 2013
50, 100, 200, 400 y 500	Soya	A 500 mg L ⁻¹ se redujo el contenido de clorofila	Medio Murashige y Skoog	Prakash <i>et al.</i> , 2014
100, 200, 400 y 600	Pepino	Reducción de la germinación e inhibición de la elongación radicular	Cajas de Petri	Moon <i>et al.</i> , 2014
20, 50, 100, 200 y 500	Frijol mungo	Inhibe el desarrollo de la raíz y reduce el contenido de clorofila	Medio Murashige y Skoog	Nair <i>et al.</i> , 2014
5, 10 y 20	Lechuga Alfalfa	Reducción de la germinación, inhibición radicular y reducción de biomasa	Sistema hidropónico	Hong <i>et al.</i> , 2015
20 y 80	Cilantro	Reducción de la germinación y elongación del tallo	Sustrato	Zuverza <i>et al.</i> , 2015
20, 50, 100, 200, 400 y 500	Mostaza	Inhibición del crecimiento de tallo y raíz	Medio Murashige y Skoog	Prakash <i>et al.</i> , 2015
2.5, 10, 50, 100 y 1000	Arroz	Reducción en la tasa de germinación, biomasa del tallo y contenido de clorofila	Solución Hoagland	Da Costa <i>et al.</i> , 2016
5 10, 20, 40 y 80	Cebolla	Inhibición de la elongación de la raíz y daño en la zona meristemática	Suspensión	Deng <i>et al.</i> , 2016
10	Maíz	Incremento de biomasa	Semi-hidropónico	Adhikari <i>et al.</i> , 2016
10, 50, 100 y 500	Tomate Col	Reducción en el contenido de clorofila y de azúcar. A 10 mg kg ⁻¹ las plantas de tomate incrementaron el contenido de esas variables	Arena	Singh <i>et al.</i> , 2017

Adaptado de Liu, 2015; Siddiqui *et al.*, 2015; Kole *et al.*, 2016; Chhipa, 2017; Du *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2017. Rajput *et al.*, 2018.

Dentro de los esfuerzos por evaluar el efecto de este micronutriente suministrado en un tamaño nanométrico, ha sido posible contribuir a establecer los rangos de concentración adecuados de aplicación, además de evaluar diferentes medios de suministro y difusión de las NPs que van desde sistemas

hidropónicos, semihidropónicos con soluciones nutritivas modificadas (principalmente Hoagland), en medio semisólido (Murashige y Skoog), suelo, sustratos y en soluciones simples ($\text{H}_2\text{O} + \text{NPs}$) contenidas en cajas Petri; sin embargo cabe destacar que la efectividad dependerá de la especie en particular, la vía de administración de las NPs y tiempo de contacto (Kole *et al.*, 2016).

Por ejemplo, en el trabajo de Sabir *et al.* (2018) se analizó el efecto de diferentes concentraciones de NPs Cu en semillas de trigo (*Triticum aestivum*) (25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹). El mayor porcentaje de germinación se observó en semillas tratadas con bajas concentraciones (25 y 50 mg L⁻¹). Además, se registró un aumento significativo en la biomasa fresca y seca de la raíz, la longitud de esta y el crecimiento radicular a esas concentraciones bajas, en comparación con el control. Sin embargo, el tratamiento con NPs Cu con dosis superiores a 75 mg L⁻¹ mostró una germinación tardía y un efecto inhibitorio general sobre el crecimiento de las plántulas. Los resultados de este experimento fueron discordantes, ya que revelaron que la aplicación de NPs Cu mejoró la germinación en trigo, pero también llegó a causar fitotoxicidad. Por su parte, Singh *et al.* (2017), señalaron que el efecto en la germinación y promoción del crecimiento de plantas de *Vigna radiata*, mostró que la germinación máxima fue registrada con 100 mg L⁻¹ de NPs CuO; mientras que los iones de cobre mostraron efectos adversos sobre el crecimiento de las raíces. Este informe demuestra el efecto positivo de las NPs CuO en la germinación de semillas, en el crecimiento y la nutrición; por lo tanto, las NPs CuO podrían usarse como un nanofertilizante después de ensayos extensivos adicionales en vivero.

Passam *et al.* (2007) informaron que el Cu en concentraciones de 10^{-14} a 10^{-16} M son requeridas para el desarrollo normal de la planta, por debajo de las cuales se produce la deficiencia. La deficiencia y fitotoxicidad de Cu en las plantas se expresa en hojas rizadas; pecíolos doblados hacia abajo y clorosis ligera, así como pérdida permanente de turgencia en las hojas jóvenes; y a nivel fisiológico, lo que ocurre es una inhibición del crecimiento, interferencias en la fotosíntesis, fotorrespiración y aumenta el estrés oxidativo (Yruela, 2005; Passam *et al.*, 2007; Manceau *et al.*, 2008).

Con el uso extensivo de las NPs CuO ha aumentado la preocupación sobre su posible impacto tóxico en el ecosistema y la salud humana debido a su incorporación en diferentes productos al ambiente (Chen *et al.* 2012; Nair y Chung, 2014). Aunque, por otro lado, semillas tratadas con bajas concentraciones de NPs CuO han mostrado efectos significativos a favor de la producción de biomasa (Lira *et al.*, 2018). El efecto de las NP de Cu en las células vegetales no se ha estudiado suficientemente y los resultados disponibles son algo contradictorios. Por un lado, pueden ejercer su impacto tóxico al penetrar la célula directamente, aparentemente al causar daño oxidativo a las estructuras y moléculas celulares (Garnett, 2007; Lee *et al.*, 2008) y, por otro lado, han mostrado efectos positivos sobre la germinación (Shah y Belozeroova, 2009).

Los productos convencionales a base de Cu son ampliamente utilizados para hacer un manejo preventivo y/o correctivo ante la presencia de enfermedades, principalmente causadas por microorganismos fitopatógenos mediante un modo de acción múltiple (generación de radicales OH⁻ que dañan diferentes biomoléculas; Haq y Ijaz, 2019) por lo que la probabilidad de generar resistencia es mínima (Malandrakis *et al.*, 2019) y al promover la aplicación de nanocompuestos a base de Cu, se reduce la posibilidad de tener deposiciones residuales en lugares no objetivo y se incrementa la eficiencia de las aplicaciones al no tener barrera física que limite su ingreso a la planta, destacando la característica dual de este elemento que funge de fungicida/bactericida y nutriente (Shang *et al.*, 2019) dotando así de una protección cruzada a los cultivos, incrementando la eficiencia de la función del Cu y reduciendo la deposición residual de agroquímicos de composición macromolecular, que llega a alcanzar tasas de desperdicio equivalentes al 90 % del producto aplicado (Shang *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2016). Su eficiencia ha quedado corroborada, como en el caso de las NPs Cu contra la mancha bacteriana en arroz y en otro bioensayo con frijol mungo (Haq y Ijaz, 2019).

2.7 Interacción de los nanomateriales con los sistemas vegetales

El ingreso de los NMs no tiene restricción por parte de los mecanismos que fungen como barrera física en los diferentes niveles de la estructura vegetal, como son los diferentes puntos de acceso a las células, ya sean los estomas (aproximadamente 10 µm; Franks *et al.*, 2007), plasmodesmos (50 nm; Ueki *et al.*, 2014), espacios libres de Donnan y canales transportadores de las membranas. Esto debido a las dimensiones espaciales características de los materiales nanométricos, ya que al ser de menor tamaño que los poros antes mencionados, tienen la facultad de transitar desde el exterior por el apoplasto y simplasto hasta el interior del citoplasma (Adhikari, 2012; Buchanan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Chhipa, 2017).

El ingreso de los NMs representa una condición de estrés al sistema vegetal, las plantas están en permanente interacción con el ambiente dentro de una dinámica que tiende a conservar un equilibrio (homeostasis) en todos sus niveles de organización, debido a procesos adaptativos y de evolución, las plantas han logrado desarrollar cierto grado de sensibilidad en su nivel más elemental, el celular; este grado de sensibilidad se deriva de diversos tipos de gradientes (hídricos, químicos y eléctricos) entre los diferentes compartimentos (apoplasto, simplasto, membranas, citoplasma y organelos), los que en conjunto permiten con la intervención de proteínas específicas, presentes en sus membranas (para el caso de citoplasma y organelos), percibir alteraciones en una o varias condiciones ambientales dadas, activando en consecuencia respuestas metabólicas que originan mecanismos de ajuste que se traducen en estrategias para tratar de alcanzar un nuevo estado de equilibrio que le permita sobrevivir y concretar su ciclo biológico (Gupta *et al.*, 2016).

El ambiente va a estar conformado por 2 tipos de factores, que pueden a su vez, dar lugar a dos tipos de estrés dependiendo del tipo de factor que lo induzca: biótico o abiótico (Verslues *et al.*, 2006). Dentro del primero se encuentran todos los organismos que son objeto de estudio de la entomología (artrópodos), fitopatología (enfermedades) y malherbología (especies arvenses). En cambio, como factores abióticos se consideran: la temperatura, humedad, luz (fotoperiodo), presión, disponibilidad de agua, oxígeno, carbono, pH; fertilidad del suelo o sustrato y concentración de sales (Mantri *et al.*, 2012; Mosa *et al.*, 2017). Hay un rango dentro de los diferentes parámetros de los factores mencionados en los cuáles el desarrollo de la planta de interés será óptimo y sus procesos metabólicos más eficientes; sin embargo, si hay una alteración significativa en alguno de los factores mencionados, el estado de equilibrio con la planta se logrará según el grado de alteración lo permita, llevando con ello una serie de ajustes intrínsecos dirigidos a garantizar la continuidad de los procesos metabólicos vitales, que garanticen la supervivencia de la especie (Buchanan *et al.*, 2012). La percepción del cambio en el entorno (tipo biótico o abiótico) por parte de la planta va a implicar la generación de un estímulo conjugado iniciado por una descompensación iónica y por una desregulación osmótica, que de ser sostenida provocará una producción atípica de ERO, dando lugar al estrés oxidativo (Ahmad *et al.*, 2012; Mosa *et al.*, 2017); dicha percepción debe considerar dos condiciones diferentes para la planta, una, donde el estado de equilibrio alcanzado hace que la integridad de la planta esté comprometida (últimas etapas del estrés oxidativo) y otro, donde esta condición funja como plataforma para inducir una respuesta agrónomicamente deseada (sobrecompensación). Lo anterior caracterizado por un incremento en la actividad antioxidante y la tasa de procesos anabólicos que dan lugar a una mayor producción de biomasa (Figura 4), siendo únicamente posible dentro de la primera etapa del estrés que se describirá más adelante (Mosa *et al.*, 2017). Estos ajustes derivados de una condición de estrés provocada por algunos de los factores abióticos han sido la clave para lograr desarrollar técnicas de producción intensivas más eficientes, que traen consigo un incremento en el rendimiento de los cultivos (Engin *et al.*, 2015; Mosa *et al.*, 2017).

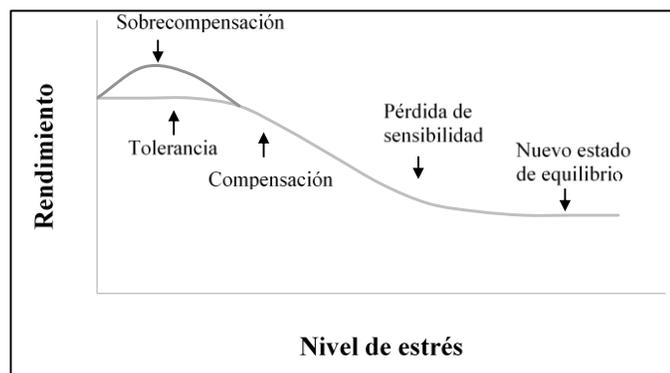


Figura 4. Curva característica de la relación estrés vs. rendimiento agrícola.

Donde en la región de sobrecompensación es posible observar una obtención de mayores rendimientos (Adaptado de Mosa *et al.*, 2017).

2.8 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo tiene lugar cuando la planta se encuentra de forma sostenida bajo una condición que queda fuera del rango óptimo para su desarrollo, comenzando así con una serie de reducciones del O_2 , dando lugar a una producción atípica a nivel celular de diferentes especies químicas inestables de oxígeno con gran capacidad de reacción, conocidas como ERO: ejemplo de éstas son: el ion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete (1O_2), y el ion hidroxilo (OH^-) (Sunkar, 2010). El grado de estrés oxidativo generado puede dividirse en 3 etapas caracterizadas por eventos metabólicos definidos (Gupta *et al.*, 2016):

1. Desbalance iónico por desregulación en la disponibilidad de electrones en el medio. Una condición de sobrecompensación será posible sólo en esta fase.
2. Daño oxidativo. Es perceptible visualmente, derivado de la afectación en proteínas y lípidos (oxidación y peroxidación, respectivamente), así como en la ruta de síntesis de clorofila, provocando una fotoinhibición.
3. Muerte celular (necrosis o apoptosis). Ocurre cuando el daño ha logrado afectar al ADN.

Para que las plantas tengan la capacidad de activar su mecanismo de respuesta ante la presencia de ERO, tiene que haber en principio una señal propagada en el interior de la célula que dé como resultado la síntesis de proteínas funcionales, de regulación (enzimas antioxidantes); su funcionalización; o bien, la síntesis de un compuesto antioxidante (Mosa *et al.*, 2017). La forma de cómo ese estímulo se filtra por las barreras celulares hasta llegar al citoplasma y organelos involucrados, en inicio implica la comunicación entre el apoplasto y el citoplasma, la cual es posible debido a un gradiente en la concentración de Ca^{+2} que desencadena la participación de proteínas receptoras de dicha señal y su fosforilación ; donde la concentración de Ca^{+2} está ligada, entre otros factores a la presencia de ERO, así las proteínas que se fosforilan (quinasas) o desfosforilan según el caso, a su vez, activan una fosforilación subsiguiente en otra proteína, generando una reacción en cadena hasta que dicho estímulo llega a convertirse en una respuesta de activación de diversas rutas metabólicas antioxidantes que lleven de nuevo a recuperar la homeostasis celular (Gupta *et al.*, 2016; Gerth *et al.*, 2017). El rumbo que pueden tomar en un principio dichas rutas depende si en éstas hay enzimas antioxidantes involucradas o no, reconociendo así dos condiciones

generales del proceso: uno enzimático y otro no enzimático (Buchanan *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2016; Mosa *et al.*, 2017).

2.8.1 Respuesta antioxidante

Este proceso tiene como principal objetivo procurar el balance redox en ciertos organelos como: cloroplastos mitocondrias, peroxisomas, glioxisomas y también en el citosol; para el caso del primer tipo de respuesta anteriormente mencionada (enzimática), las enzimas se encargarán de llevar a cabo la catálisis de la conversión de las ERO en especies inocuas (Sunkar, 2010; Katoch, 2011; Gupta *et al.*, 2016). La presencia prolongada de ERO provoca la oxidación de compuestos que van desde el nivel más simple como los metabolitos, hasta estructuras más complejas como las biomoléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.), siendo de éstas, los ácidos grasos (lípidos de las membranas) los primeros afectados (Sunkar, 2010; Adhikari, 2012; Buchanan *et al.*, 2012). Ante este escenario, la condición homeostática en la célula obliga a la generación de un efecto contrarrestante, donde si participan enzimas, lo harán mediante la intervención de diferentes complejos conformados principalmente por peroxidasas (POX), catalasas (CAT), superóxido dismutasas (SOD), ascorbato-peroxidasas (APX) entre otras; las reacciones de tres de las cuatro enzimas mencionadas, tendrán como productos finales agua y oxígeno (H_2O y O_2), en el caso de la reacción catalizada por las superóxido dismutasas, el producto intermedio obtenido será H_2O_2 , que posteriormente se convierte en sustrato para la intervención de las peroxidasas (Buchanan *et al.*, 2012; Mittler, 2017). Hay casos en los que la condición de estrés es sostenida y el conjunto antioxidante no logra la total conversión a H_2O y O_2 , entonces tiene lugar un equilibrio celular alejado del estado óptimo pero que permite a las células llevar a cabo sus funciones anabólicas vitales como la fotosíntesis y síntesis de proteínas de manera regular; en este punto se presentará una condición generalizada de reducción de moléculas de alta masa molecular (e.g. glucosa, sacarosa, complejos proteicos completos y lípidos), aumentando aquellas de baja masa molecular (e.g. prolina, ciertas proteínas, glicina betaína, manitol y sorbitol) (Ahmad *et al.*, 2012). La respuesta no enzimática involucra la reducción de metabolitos lipofílicos como tocoferoles, carotenoides y otros metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, alcaloides, etc.) (Vera *et al.*, 2015), o bien lipófilos como el ascorbato y el glutatión, para evitar las reducciones parciales o sucesivas del oxígeno (O_2) que dan lugar a diferentes ERO (Lodeyro *et al.*, 2015; Courtney *et al.*, 2016).

2.9 Técnicas de evaluación de los nanomateriales en sistemas vegetales de interés agrícola.

El efecto de los NMs en general se ha estudiado en diversas especies de interés agrícola (Kole *et al.*, 2016); donde se ha observado un efecto positivo en la tasa de germinación, vigor de la plántula e incremento en la actividad fotosintética (Arruda; Grillo, 2015; Barrios *et al.*; Zuverza *et al.*, 2016). Al respecto, cabe destacar que la mayoría de los estudios se realizan en etapas fenológicas tempranas de los

cultivos (i.e. germinación y nivel plántula), a través de la medición de los atributos morfo-fisiológicos (Kole *et al.*, 2016). Para el caso específico de los materiales grafénicos, dada su facultad de constituirse como matrices de intercambio electrónico, ha sido posible observar en los tejidos vegetales tratados, un incremento de la capacidad de retención de agua por parte de las células, debido a una mayor presencia de acuaporinas en las membranas (plasmática y tonoplasto; Khodakovskaya *et al.*, 2013) y mayor capacidad fotosintética, que deriva en una mayor producción de biomasa (Kole *et al.*, 2016).

La identificación de fenotipos mejor adaptados ante diversas condiciones ambientales ha sido una actividad persistente dentro de las investigaciones agronómicas, destacando que un genotipo idéntico puede presentar más de un fenotipo ante diferentes condiciones ambientales (Kumar *et al.*, 2015); marcando con ello, la apertura hacia la búsqueda de la respuesta sobre los mecanismos reguladores del genoma en función del ambiente (observables a través de una expresión fenotípica diferenciada) (Engin *et al.*, 2015). Reconociendo al ambiente como factor limitante en la producción agrícola, surgieron diferentes líneas de enfoque dirigidas a explicar de forma concreta su sobre el fenotipo, mejor conocidas como ciencias “omics” (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) (Shahzad *et al.*, 2016); donde en el caso de la genómica, se busca descifrar el enigma a partir de la relación en la expresión de ciertos genes ante condiciones cambiantes en el ambiente; por su parte la transcriptómica, lo pretende desde la función de sus transcritos (RNAm -ácido ribonucleico mensajero), la proteómica desde la dinámica entre sus proteínas y la metabolómica desde la presencia diferencial en la concentración de metabolitos en los diferentes niveles de organización de la planta (Barh *et al.*, 2015). Es importante no perder una perspectiva amplia e integrativa sobre la interacción y utilidad de cada una de las “omics”. Sin embargo, la ventaja de la proteómica es que considera ya la fracción funcional de genes y transcritos, recordando que el fin de éstos, es dar lugar a la síntesis o expresión de una proteína (Aydin *et al.*, 2016); considerando a estas últimas (proteómica) como biomoléculas fundamentales de referencia para explicar los cambios derivados de la aplicación de los NMs mencionados (grafeno y NP CuO).

Las proteínas son macromoléculas inherentes a los sistemas biológicos, conformadas por la unión de aminoácidos, su función va a estar determinada por las propiedades de éstos. Una característica muy importante de estas biomoléculas es que siempre alcanzarán un punto de equilibrio entre las cargas de los aminoácidos que las conforman (igual número de cargas positivas y negativas; punto isoelectrico), este punto isoelectrico se utiliza para identificarlas y clasificarlas correctamente, ya que una clasificación basada sólo en un principio de masa es insuficiente, porque varias proteínas pueden presentar la misma masa, pero nunca un idéntico punto isoelectrico. Conjugando ambos principios (cargas y masa), es posible la obtener una representación gráfica de todas las proteínas activadas e involucradas en la respuesta metabólica por

parte de la planta (patrones proteómicos) ante la variación en cierta condición del ambiente en un momento específico (aplicación de NMs), pudiendo encontrar proteínas involucradas en la señalización (quinasas), transporte de nutrientes específicos (canales transportadores), síntesis de fitorreguladores y cutina, reacciones de óxido-reducción (redox), etc. (Buxbaum, 2015; Barh *et al.*, 2015). La importancia de integrar a la proteómica como herramienta de evaluación de NPs en sistemas vegetales, radica en que no hay ruta anabólica o catabólica que se lleve a cabo sin la participación de las proteínas, ya sea por su función, estructura, señalización, comunicación, etc.; el tipo, estructura y momento en que se exprese un grupo de estas biomoléculas, va a arrojar información sobre la interacción del organismo con el ambiente, basada en la capacidad que tenga el primero para adaptarse ante cualquier cambio que se presente; en el segundo, una nueva organización y dinámica intracelular será posible gracias a la adaptación y/o nueva conformación de complejos proteicos; en este caso, dicho factor será representado por la incorporación de NMs en el sistema (grafeno y NPs CuO) (Buxbaum, 2015; Gupta *et al.*, 2015a; Aydin *et al.*, 2016).

Si las plantas ante la exposición al grafeno y/o NPs CuO no lograran una condición compensatoria de equilibrio adecuada, los signos de daño en los tejidos predominantes observables serán: inhibición del crecimiento de la radícula, menor producción de biomasa, necrosis foliar y radicular (Wang, 2012; Mittler, 2017). De manera paralela, la determinación de la actividad enzimática antioxidante permitirá contar con una estimación inicial sobre la tolerancia potencial al estrés inducido por el grafeno y NPs CuO en plantas de calabaza. El integrar los resultados de las pruebas fisiológicas, bioquímicas y de proteómica se planteó para brindar una explicación más integral de lo ocurrido ante la generación de estrés celular vegetal inducido por los NMs mencionados.

3. Hipótesis.

La aplicación de grafeno y/o nanopartículas de óxido de cobre modificarán las respuestas fisiológicas y bioquímicas involucradas en la germinación, el crecimiento y desarrollo de plántulas de *C. pepo*.

4. Objetivo general

Analizar los cambios fisiológicos y bioquímicos durante la etapa vegetativa de plantas de *C. pepo*, derivados de la aplicación de grafeno y/o NPs CuO, asociándolos con los cambios del perfil proteómico de esta cucurbitácea.

4.1.1 Objetivos particulares

- Determinar la concentración de grafeno y/o NPs CuO que tenga un efecto promotor de germinación y vigor en semillas de calabacita, mediante un barrido de concentraciones, así como el posible efecto fitotóxico de las concentraciones elevadas de estos NMs.
- Realizar el análisis proteómico diferencial en plántulas de *C. pepo* que presentaron un cambio morfológico importante, expuestas a la aplicación de grafeno y/o NPs CuO, para entender el mecanismo de acción por el cual realiza dichos cambios.
- Analizar el efecto fisiológico del grafeno y de las NPs CuO en el desarrollo de las plantas de calabacita crecidas en sustrato, a partir de las dosis identificadas en el bioensayo de geminación, por su efecto en los cambios morfológicos en las plántulas de *C. pepo*.
- Determinar parámetros bioquímicos asociados a condiciones de estrés: H₂O₂, clorofila, actividad enzimática antioxidante (SOD, POX, APX y CAT) y contenido de prolina dentro de los tejidos expuestos directamente a la aplicación del grafeno y NPs CuO a los 25 días después de emergidas, bajo condiciones de crecimiento en sustrato con temperatura y fotoperiodo controlados.

5. Materiales y Métodos

5.1 Preparación de las suspensiones de grafeno y nanopartículas de óxido de cobre

Se utilizó grafeno HD Plas™ de Cheap Tubes Inc., con una longitud de hojuela promedio de 1-3 μm , un área superficial $> 700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, pureza de aproximadamente 99 % en peso y densidad de 2.2 g cm^{-3} . Con la finalidad de disminuir el número de capas del grafeno, se le realizó un tratamiento mediante el uso de ultrasonido en ausencia de solvente.

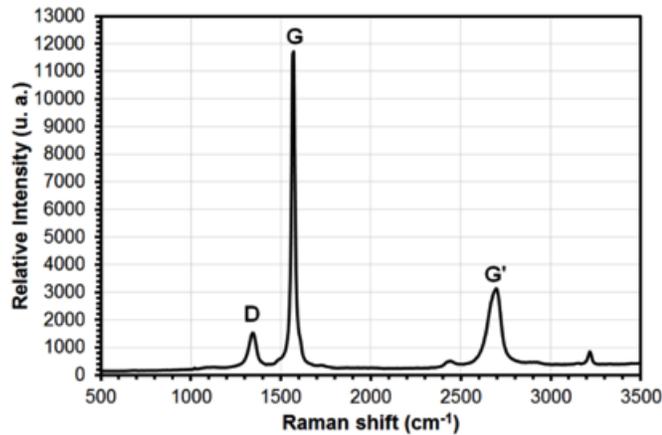


Figura 5. Espectroscopía Raman del grafeno utilizado en este trabajo de investigación
(Diagrama facilitado por Dra. Adriana Espinoza Martínez-CIQA).

En la Figura 5 se muestra el espectro Raman para el grafeno exfoliado a por ultrasonido, donde es posible observar las tres bandas principales: La banda D en 1336 y 1342 cm^{-1} asociada a la hibridación sp^3 originada por los defectos en la capa de grafeno, la banda G a 1559 y 1566 cm^{-1} está relacionada con todas las formas de carbono sp^2 y finalmente la banda 2D a 2692 y 2676 cm^{-1} .

En el caso de las suspensiones de NPs CuO, se prepararon a partir de material comercial obtenido de Nanostructured & Amorphous Materials, Inc., Katy, TX, USA, cuyas principales características se muestran en la siguiente figura (6), destacando un tamaño comprendido entre 10 y 60 nm, teniendo un valor de moda de 25 nm.

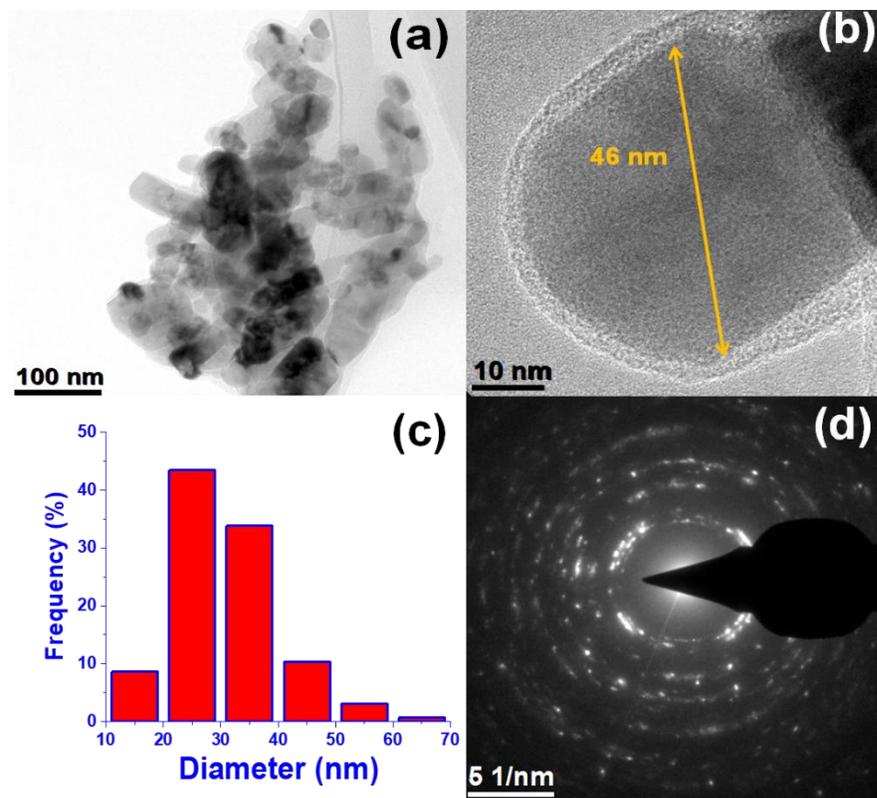


Figura 6. Micrografías de las nanopartículas de óxido de cobre.

a) Forma de las NPs CuO, b) Imagen HRTEM, c) Tamaño promedio de las NPs CuO, d) Patrón SAED obtenido del área observada en el panel.

Con ambos NMs se prepararon suspensiones acuosas con diferentes concentraciones de grafeno y NPs CuO. Utilizando para el caso del grafeno, agua desionizada estéril y 100 μL de bionex[®] (alcohol tridecílico polioxietilenado+ nonil fenol polioxietilenado + propilenglicol), como fase dispersante; estos últimos, empleados para preparar la solución del tratamiento control (agua + bionex[®]). En el caso de las suspensiones de las NPs CuO, como fase dispersante solo se empleó agua desionizada estéril. Previo a colocar las semillas en imbibición, las suspensiones fueron sometidas a un proceso de sonicación de baño (*Branson 2510*) por un intervalo de tiempo de 10 min. Las concentraciones que se evaluaron estuvieron comprendidas en un rango de 0 a 1000 mg L^{-1} (0, 25, 50, 100, 250, 400, 500, 750 y 1000 mg L^{-1}) para ambos NMs.

5.2 Prueba de germinación estándar - ISTA

Para realizar este ensayo, las semillas (*C. pepo* var. Grey Zucchini; Seminis[®]) se pusieron a imbibir en las diferentes suspensiones de grafeno, NPs CuO y la soluciones control, por 36 h de acuerdo a la curva de imbibición realizada (Anexo – A.1), se prepararon las unidades experimentales ("tacos de germinación")

donde 25 semillas imbibidas en una misma suspensión (dependiendo del tratamiento), se dispusieron de forma alineada entre 2 hojas de papel Anchor húmedo (agua destilada), respetando un margen superior de 13 cm, externos de 2.5 cm y una distancia entre semillas de 0.5 cm (ver Anexo – A.1); al finalizar la colocación de las semillas, las hojas fueron dobladas para formar un “taco”, procurando darle un ancho de 5 cm, para finalmente colocarlas de manera vertical dentro de bolsas de polietileno transparente y éstas a su vez dentro de una canasta bajo condiciones controladas de temperatura en una cámara de crecimiento (*Equitec*) a 25 ± 2 ° C con fotoperiodo de 16 h luz, 8 h oscuridad. El bioensayo consistió en 9 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento; considerando como control la solución de agua + bionex ®. Este bioensayo fue realizado por triplicado. Para la evaluación de las semillas, la metodología de referencia (Asociación Internacional de Evaluación de Semillas; ISTA, 2014) establece 2 momentos para llevarla a cabo, siendo específicos para *C. pepo*, uno al cuarto día después de haber realizado la siembra y el segundo, al octavo día.

En la primera evaluación se cuantificaron las semillas germinadas y las plántulas con un desarrollo “normal” dentro de los parámetros estipulados en la metodología (ISTA, 2014). Éstos son: presencia de todas las estructuras morfológicas características de una plántula dicotiledónea hasta ese momento (4° día); es decir, por parte del sistema radicular: una raíz primaria bien formada y de mayor tamaño que las raíces secundarias, gravitropismo definido, inicio del desarrollo de las raíces secundarias; en cuanto a la característica más importante que debe cumplir de manera general la plúmula en las plántulas a evaluar en la primera sesión, es que su largo debe ser por lo menos 3 veces mayor al largo de la semilla. Al término de esta evaluación, los datos sobre el número de semillas germinadas se consideraron para expresar en términos relativos el efecto del tratamiento sobre este proceso (germinación) mediante la siguiente ecuación (% G, Ecuación 1) (Moukrad *et al.* 2014).

$$\% G = \frac{SG \times 100}{TS}$$

(Ecuación 1)

Donde:

% G = Porcentaje de germinación.

SG = Número de semillas germinadas.

TS = Número de semillas totales.

Para la segunda evaluación (día 8), se obtuvo el número de plántulas con desarrollo normal y también de aquellas con un desarrollo anormal (pérdida de dominancia apical radicular, coloración atípica

o clorosis, o bien, malformación de tejidos -hipo o hiperplasias-, daño cotiledonear >50 %, enanismo, etc.), con el fin de determinar el índice de vigor (%) de las semillas bajo los diferentes tratamientos. Para ello, se consideró el número de plántulas que cumplieron con los criterios mencionados en cuanto a la morfología “normal” característica de la especie para los periodos establecidos. Los datos obtenidos se procesaron para denotar su representación relativa mediante la ecuación 2 (ISTA, 2014).

$$V = \frac{PN \times 100}{TS}$$

(Ecuación 2)

Donde:

V = Vigor (%).

PN = Número de plántulas normales.

TS = Total de semillas.

Para complementar la información, sobre la germinación se integraron los datos obtenidos de las variables:

- Longitud de plúmula (LP; expresada en mm).
- Longitud de radícula (LR; expresada en mm).
- Contenido de biomasa (CB; expresada en mg).

En cuanto al contenido de biomasa, se realizó registrando la masa en fresco de la plántula completa (mg). Posteriormente, las muestras se introdujeron en una estufa de secado, sometiéndolas a una temperatura de 72 ° C por 24 h. Transcurrido este periodo, se registró la masa de las muestras (secas) correspondientes. Para este ensayo se tomaron 10 plántulas de cada “taco”, es decir de cada repetición, siendo seleccionadas de manera aleatoria.

5.3 Pruebas asociadas al estrés oxidativo

5.3.1 Determinación cualitativa y cuantitativa de peróxido de hidrógeno

La detección de H₂O₂ *in situ* se llevó a cabo empleando una tinción con 3-3'-diaminobenzidina (DAB) de acuerdo con la metodología propuesta por Daudi *et al.* (2012). El DAB es oxidado por el H₂O₂ en colaboración con algunas hemoproteínas, como peroxidasas, para generar un precipitado de color café en la región celular que al momento contenga H₂O₂.

Para este ensayo se preparó una solución con DAB (1:1 p/v), Tween 20 (0.1 %) y amortiguador de fosfatos (200 mM; pH 6.5). Posteriormente se realizó la separación de las plantas de su sistema radicular; el cual fue colocado al interior de una caja de Petri (una raíz/ caja), para después ser cubiertas con la solución previamente preparada. Como solución blanco se utilizó amortiguador de fosfatos 200 mM pH 6.5, donde fueron depositadas raíces correspondientes a cada uno de los tratamientos; las cajas de Petri fueron protegidas de la luz y mantenidas en agitación por un periodo de 6 h a temperatura ambiente. La selección de las raíces dentro de cada tratamiento estuvo apegada a un criterio aleatorizado. Transcurrido el tiempo mencionado, fueron observadas y fotografiadas con cámara de capacidad convencional, estereoscópica y microscópica.

5.3.2 Determinación de fenoles totales

Se llevó a cabo de acuerdo con la metodología reportada por Barku *et al.* (2013). Para obtener el extracto de calabacita a utilizar, cada muestra de 200 mg de tejido liofilizado y triturado se introdujo en una solución de metanol (80 %), la cual se sonicó durante 15 min en ausencia de luz y posteriormente se centrifugó a 1400 rpm por 5 min para colectar el sobrenadante.

Para la mezcla de reacción se consideró un volumen de 5 mL; un 5 % de extracto (v/v) reactivo de Folin ciocalteu (20 % v/v) y 0.7 M de carbonato de sodio. Se incubó en ausencia de luz por 30 min y transcurrido este tiempo, se registró su absorbancia espectrofotométrica a 765 nm. Para obtener la cantidad de fenoles en equivalentes de catequina (μg) presentes por cada gramo de tejido seco se realizó la curva estándar utilizando diferentes concentraciones de catequina dentro de un rango de 0-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($y = 0.0013x + 0.0392$; ver Anexo: A.3.).

5.3.3 Cuantificación de prolina

Se realizó con apego a lo publicado por Abraham *et al.* (2010). A cada muestra de 500 mg de tejido, triturada con nitrógeno líquido y contenida en un tubo de ensayo, le fue agregada una solución al 3 % de ácido salicílico frío, para centrifugarse a máxima velocidad durante 5 min; y obtener el extracto de interés (sobrenadante); del cual se tomaron 200 μL para preparar la mezcla de reacción (700 μL), que consistió además en agregar ácido sulfosalicílico (0.43 %), ácido acético glacial (28.6 %) y ninhidrina acidificada (ácido fosfórico 6 M) en la misma proporción volumétrica que el ácido acético glacial; una vez agregada la ninhidrina la mezcla fue incubada a 96 ° C por 1 h. La reacción se terminó generando un choque térmico, transfiriendo los tubos contenedores a una temperatura de 4 ° C. Una vez que las muestras alcanzaron una temperatura constante, se les agregó 1 mL de tolueno para hacer la separación de la fase orgánica, después de agitarse vigorosamente, se dejaron en reposo por 5 min a temperatura ambiente. Se registró su

absorbancia a 520 nm. Para obtener la cantidad de prolina (μg) por cada gramo de tejido de *C. pepo*, se integró la absorbancia como variable dependiente en el modelo obtenido de la curva estándar generada a partir de diferentes concentraciones de prolina (0.019, 0.039, 0.059, 0.079, 0.099 $\mu\text{mol L}^{-1}$; ver Anexo - A.5).

5.3.4 Cuantificación de clorofila a, b y total

El contenido de clorofila se determinó por el método descrito por Abraham *et al.* (2010). Donde a partir de 100 mg de tejido foliar congelado, triturado y suspendido en etanol al 80 %, se generó una alícuota, tras centrifugarse a 10,000 rpm por 15 min. Al ser un pigmento fotosensible, fue conservado en condiciones de oscuridad hasta ser estimada su absorbancia utilizando un espectrofotómetro (*Genesys 10 uv*) a una longitud de onda para la clorofila *a* de 645 nm y para la de clorofila *b*, de 663 nm.

El contenido total de clorofila se determinó con las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = [(12.7 * \text{Absorbancia a 663nm}) - (2.63 * \text{Absorbancia a 645 nm})] * \left(\frac{V}{1000 * w}\right)$$

$$\text{Clorofila b} = [(22.9 * \text{Absorbancia a 645 nm}) - (4.68 * \text{Absorbancia a 663 nm})] * \left(\frac{V}{1000 * w}\right)$$

$$\text{Clorofila Total} = [(20.2 * \text{Absorbancia a 645 nm}) + (8.02 * \text{Absorbancia a 663 nm})] * \left(\frac{V}{1000 * w}\right)$$

Donde:

Absorbancia (663) = Absorbancia a 663 nm.

Absorbancia (645) = Absorbancia a 645 nm.

V = Volumen final de la solución (mL).

w = Peso fresco de la hoja (g).

5.3.5 Actividad enzimática antioxidante

Para realizar la determinación de la actividad de estas enzimas, se realizó un extracto enzimático de acuerdo con la metodología reportada por Elavarthi y Martin (2010); la cual nos permite evaluar las enzimas mencionadas con el mismo extracto. A 500 mg de tejido triturado con nitrógeno líquido, se le adicionó 5 % (m/m) de polivinilpirrolidona (PVP); para posteriormente añadir el amortiguador de extracción (1 mL), que

consistió en un amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7 adicionado con EDTA (0.1 mM). Para obtener el extracto mencionado, cada mezcla fue centrifugada por 5 min a 12,000 rpm.

5.3.5.1 Actividad de Superóxido Dismutasas (SOD)

La cuantificación de esta enzima se realizó con el kit (Superoxide dismutase Assay Kit) para cuantificar SOD (Sigma-Aldrich, 2014) siguiendo la metodología sugerida por el proveedor. Su principio se basa en el cambio de color del agente de tinción con características oxidantes, para ello se empleó la xantina oxidasa y como colorante nitro-azul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés), que al reducirse por la presencia de superóxido cambia a color azul, siendo necesario registrar la absorbancia de las mezclas de reacción (450 nm). Para determinar la actividad enzimática (unidades volumétricas) de las superóxido dismutasas, se utilizó la siguiente fórmula (Sigma-Aldrich, 2014):

$$U/ mL = \frac{(\% \text{ de inhibición})(\text{Factor de dilución})}{(50 \%)(0.1)}$$

El cálculo del % inhibición se muestra en el anexo (A.4).

El porcentaje de inhibición de SOD es resultado de la actividad de la xantina oxidasa y la reducción del O₂. Posteriormente se estimará la actividad de SOD por cada mg de proteína presente en el tejido (Unidades de actividad enzimática/mg de proteína), utilizando el bioensayo con reactivo de Bradford como referencia.

5.3.5.2 Actividad de Peroxidasas (POX)

La mezcla de reacción consistió en 100 mM de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5, 3 mM de peróxido de hidrógeno, 15 mM de pirogalol y extracto enzimático (1 % v/v) en un volumen de 3 mL. La reacción comenzó con la adición de H₂O₂, se registró la absorbancia a 420 nm cada 20 s por 1 min ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de acuerdo con la metodología reportada por Kwak *et al.* (1995). La actividad de POX es definida como la cantidad de enzima que produce un μmol de pirogalol oxidado por minuto (Unidades de actividad enzimática* mg de proteína⁻¹).

5.3.5.3 Actividad de Ascorbato Peroxidasas (APX)

La mezcla de reacción se consideró para un volumen de 1 mL, el cual consistió en 50 mM de solución amortiguadora de fosfatos pH 7, una proporción 1:1 de ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno (10 mM) y extracto enzimático (3 % v/v) de acuerdo con la metodología reportada por Elavarthi y Martin (2010). La reacción se inició con la adición de H₂O₂ y se registró la absorbancia a 290 nm cada 20 s por 1

min ($\epsilon = 2.211 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad de APX es definida como la cantidad de enzima necesaria que produce un μmol de ascorbato oxidado por minuto (Unidades de actividad enzimática* mg de proteína $^{-1}$).

5.3.5.4 Actividad de catalasas (CAT)

La mezcla de reacción consistió en 50 mM de solución amortiguadora de fosfatos pH 7, peróxido de hidrógeno (0.5 M) y la cantidad de proteína contenida en cada muestra, en un volumen de 1 ml (5 % v/v); 108, 140 y 126 μg de proteína por mL en los tratamientos con grafeno, 25 mg NP CuO L^{-1} y 250 mg NP CuO L^{-1} , respectivamente. La reacción se inició con la adición de H_2O_2 , se registró la absorbancia a 240 nm cada 20 s por 1 min ($\epsilon = 2.640 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Expresando la actividad de estas enzimas como los μmoles de H_2O_2 degradados por minuto por gramo de proteína contenido en el tejido. (Katoch, 2011).

5.3.5.5 Determinación del contenido de proteína por el método Bradford

Para llevar las unidades volumétricas de la actividad enzimática a unidades de actividad específica, se realizó esta prueba, donde se preparó un volumen de reacción de 5.1 mL con un 2 % de extracto enzimático y el resto de reactivo de Bradford (Bio rad), se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro (*Genesys 10 uv*) a 595nm (Kruger, 2009). De cada tratamiento se consideraron 4 repeticiones y cada muestra se procesó por triplicado. Para la obtención del contenido de proteína por muestra se hizo una curva estándar con diferentes concentraciones de BSA; con la cual se obtuvo el modelo ($y = 0.026 x + 0.3122$; ver Anexo – A.4) donde se introdujeron los valores obtenidos de absorbancia como variable dependiente.

5.3.6 Proteómica diferencial

A partir de las observaciones más destacadas según los cambios morfológicos de las estructuras presentadas en las pruebas de germinación con ambos NMs, se realizó el análisis proteómico diferencial de las concentraciones, en el caso del grafeno de 1000 mg L^{-1} y para el caso de NPs CuO se decidió dar seguimiento al proteoma generado a partir de una condición de fitotoxicidad reflejada en cambios morfológicos en las plántulas tratadas bajo la dosis de 250 mg L^{-1} .

5.3.7 Extracción de proteína

La extracción se hizo a partir de una lisis celular provocada por la trituración con nitrógeno líquido de 500 mg de tejido fresco proveniente de la raíz en el caso del grafeno y de la parte aérea para las muestras de NPs CuO; tomando órganos diferentes en el caso del grafeno porque no se ha reportado el impacto que tiene este nanomaterial sobre la composición proteica en el órgano mencionado y por lo tanto su alteración funcional: En el caso de las NPs de CuO, se eligió tejido fotosintético debido a la potencial interacción entre

éstas y los fotosistemas. Se consideraron 4 repeticiones por cada tratamiento. A la muestra triturada se le agregó 1 mL de TRI-reagent (Merck KGaA, 2018), que contiene isocianato de guanidina y fenol, compuestos que tras la adición de cloroformo y un ciclo de centrifugación a 11, 300 rpm 10 min⁻¹, permitió hacer una separación limpia y completa de la fase orgánica que contiene a las proteínas (Merck KGaA, 2018). Posteriormente, la precipitación de las proteínas en suspensión (para formar una pastilla) se logró agregando 1 mL de propanol y centrifugado a 13,000 rpm 10 min⁻¹. El precipitado fue lavado con etanol al 95 %, reposado por 20 min y sometido a centrifugación a 8, 900 rpm 5 min⁻¹; los lavados con etanol se repitieron 3 veces con el fin de obtener un comprimido proteico (pastilla) limpio. (Merck KGaA, 2018).

5.3.8 Rehidratación y cuantificación de proteína

La desnaturalización (ruptura de enlaces hidrógenos y covalentes), solubilización y reducción de las proteínas se hizo mediante una re-suspensión en amortiguador de rehidratación (Biorad) que contenía: urea (8 M), anfolinas (1 %), CHAPS- 2 %- [3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate], ditiotreitól (DTT, 65 mM) y tiourea (2 M).

La cuantificación de proteína se llevó a cabo con el 2D-Quant Kit (Amersham, USA). Con esta técnica fue posible determinar la cantidad de proteína de cada muestra eliminando las interferencias debido a los componentes del amortiguador en el que se encontraban resuspendidas. La curva estándar se realizó con BSA (suero de albumina bovino; Ver Anexo – A.6).

5.3.9 Electroforesis cualitativa

Una vez obtenido el extracto proteico de cada muestra, considerando 4 repeticiones para cada tratamiento: control y 1000 mg de grafeno L⁻¹, por un lado; y por otro, control y 250 mg de NPs CuO L⁻¹, se determinó la calidad de dicho contenido proteico mediante una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), utilizando geles de poliacrilamida al 12 %; por los cuales se hizo pasar corriente eléctrica equivalente a 120 volts. La tinción se realizó con azul de Commassie coloidal (Biorad, USA) (Vera *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2015).

5.3.10 Isoelectroenfoco

Las proteínas son macromoléculas cuyas características estructurales y funcionales estarán determinadas por las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que las conforman. Siendo una propiedad de vital importancia para las primeras (estructura y función) su capacidad de disociación cuando están en solución, resultando de utilidad para la presente investigación, el punto cuando estando en solución la carga total de los aminoácidos que las conforman es igual a 0 (punto isoelectrico; Buxbaum, 2015).

La proteómica tiene su fundamento en 2 principios: de carga (1-D) y de masa (2-D). Para ambos se realizan electroforesis, llevando un orden sucesivo, comenzando por el despliegue con base en el punto isoeléctrico (carga) y siguiendo con una electroforesis complementaria con un despliegue diferencial con referencia a la masa de las proteínas. Las electroforesis son perpendiculares entre sí.

Para la identificación de las proteínas sobre expresadas se tomó como referencia un valor máximo del índice Mascot, el punto isoeléctrico de la proteína y su peso molecular (Buxbaum, 2015).

El isoelectroenfoque (IEF) se realizó utilizando el método Running Preset (Biorad), utilizando tiras de 11 cm (IPG stripes) con un gradiente de pH conocido e inmovilizado dentro de un rango de 4-7. Esta separación fue posible debido a que cada polipéptido logra una carga igual a 0 (neutra) a diferente pH, dando lugar a diferentes puntos isoeléctricos (Vera *et al.*, 2015). Se utilizó el equipo PROTEAN IEF Cell (Biorad) (BioRad, USA). La cantidad total de proteína para cada tira (muestra) fue de 190 µg. La rehidratación de las tiras se hizo de forma activa, añadiendo aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra y cristalización de la urea. Las condiciones de la rehidratación se mencionan a continuación: por 12 h las tiras se mantuvieron a una temperatura de 20 ° C y una diferencia de potencial eléctrico de 25 V, para posteriormente realizar un acondicionamiento de las tiras mediante un incremento del voltaje a 250 V durante 15 min. Una vez finalizada la rehidratación el voltaje se incrementó de manera lineal, hasta llegar a un voltaje máximo de 4000 V, el cual se mantuvo hasta llegar a un voltaje total de 35 000 V. La cantidad de corriente eléctrica no excedió los 50 mA/ tira.

El IEF se llevó a cabo a una temperatura de 20 ° C, temperaturas mayores de 37 ° C producirían carbamilación de las proteínas y temperaturas menores a 10 ° C, ocasionarían la cristalización de la urea. Una vez cortado el flujo de corriente eléctrica, se sumergieron las tiras en aceite mineral y fueron congeladas a -20 ° C hasta su uso en la siguiente electroforesis (segunda dimensión-masa).

5.3.11 Electroforesis 2-D

Las tiras (IPG) obtenidas tras el isoelectroenfoque fueron estabilizadas con 1.5 mL de amortiguador de equilibrio I (6 M urea, SDS 2 %, amortiguador Tris/HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 20 %, DTT 2 %), manteniéndolas en agitación durante 20 min, esto con el fin de lograr la reducción de los grupos sulfhídricos; finalizado el periodo mencionado, se eliminó la solución amortiguadora por decantación y se adicionó el amortiguador de equilibrio II (urea 6 M, SDS 2 %, amortiguador Tris/ HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 20 %, yodoacetamida 2.5 %) para ahora alquilar los grupos sulfhídricos, manteniéndose en agitación por 10 min. Al finalizar el tiempo citado, las tiras se lavaron en una solución amortiguadora Tris/ Glicina/ SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1 %; pH 8.8) por un periodo de 2 min. Para lograr el desplegamiento de los

polipéptidos con base a su masa (kD) en un plano perpendicular a su desplazamiento por punto isoeléctrico, se realizó la electroforesis en una cámara vertical SE 600 (GE Healthcare Life Science, MA, E.U.A) en geles al 12 % de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 17 x 17 cm a temperatura ambiente. Se hizo pasar corriente eléctrica por 45 min a 25 mA por gel y 2.5 h a 35 mA, en una solución amortiguadora de corrida, la cual se empleó a una concentración 1x (25 mM Tris pH 8.8, 192 mM glicina y SDS 0.1 %).

Una vez desplegado el patrón proteico dentro de los geles, para evitar el desplazamiento de las proteínas, se sumergieron en una solución de fijación con metanol y ácido acético (50 y 7 %, respectivamente) por 60 min, para posteriormente teñirlos con solución fluorescente de alta sensibilidad *SYPRO Ruby* Protein Gel Stain (Biorad) durante toda la noche y finalmente hacer su lavado con una solución de metanol/ácido acético glacial (10 y 7 %, respectivamente) durante 6 h.

5.3.12 Análisis proteómico diferencial

Los geles obtenidos fueron fotodocumentados (Digital Science Image Station 2000 R, Kodak), manteniendo los mismos estándares (tamaño de la imagen, brillo, color y saturación de luz) para todos los geles; 11.73 x 13.13 cm (1848 x 2067 pixeles), para la escala de transformación de las imágenes -Image transform- (brillo y saturación de luz), se consideraron los siguientes valores: 2.216 de contraste alto, 0.000 de contraste bajo y un valor gamma de 1.00; valor mínimo de 0.000 y máximo de 2.570 (escala estándar programada en el fotodocumentador).

El análisis estadístico diferencial (t de student) de los proteomas se realizó con el programa informático PD-Quest, donde se conformaron diferentes 2 grupos de estudio con base a los tratamientos de grafeno o NPs CuO suministrados, cada grupo se compuso de 4 imágenes, correspondientes a las 4 repeticiones (geles) de cada tratamiento. Como condición de validez se impuso un coeficiente de correlación mayor de 0.7 en los geles de un mismo grupo o tratamiento. Y como proteínas (spots) inducidas o sobre-expresadas se consideraron aquellas presentes con una proporción dos veces mayor con respecto al control, éstas fueron extraídas y transferidas a tubos de microcentrífuga con 10 µL de agua desionizada estéril, para posteriormente ser congeladas inmediatamente a -20 ° C. La secuenciación peptídica de los spots o manchas seleccionadas se realizó en el Instituto de Ecología INECOL (Xalapa, Veracruz). Su digestión se llevó a cabo con tripsina (10 mg L⁻¹) conservando una temperatura de 37 ° C durante 12 h; posteriormente, se hizo una corrida espectrométrica de masas en tándem acoplado a cromatografía líquida (LC-MS / MS; Shevchenko *et al.*, 1996) utilizando un espectrómetro de masas Orbitrap Velos LTQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Para limpiar las muestras se emplearon Zip Tips (Millipore, Billerica, MA) C18 con apego al protocolo del fabricante (Millipore Corporation, 2019).

La fracción peptídica recuperada tras pasar la muestra por una precolumna C18 de 100 μm id x 2 cm (Thermo Fisher Scientific), se cargó en una columna analítica C18 de 75 μm ID x 10 cm C18 (Thermo Fisher Scientific) empleando el disolvente A (agua y 0.1 % de ácido fórmico) y un gradiente de 5 - 10 % de solvente B (acetonitrilo, 0.1 % de ácido fórmico) durante 5 min, seguido de un gradiente de 10 - 35 % de solvente B durante 35 min, posteriormente usando un gradiente de 35 – 50 % de solvente B durante 20 min, luego 50 – 95 % de gradiente de disolvente B durante 5 min, y 95 % de disolvente B durante 5 min, todas las eluciones se realizaron considerando un volumen de 400 nl min^{-1} . El análisis de datos (m/z 400–1600) se llevó a cabo en el analizador Orbitrap, seguido de espectrometría de masas en tándem (MS / MS) de disociación inducida por colisión (CID, por sus siglas en inglés) de los 14 iones más intensos en el analizador lineal de captura de iones usando el programa informático Xcalibur v 2.1.0 (Andon *et al.*, 2002) y un escaneo masivo de 60,000 unidades de resolución.

Los iones precursores se eligieron mediante la selección de precursores monoisotópicos (MIPS), los cuales establecen la aceptación o rechazo de iones en una ventana de ± 10 mg L^{-1} . La exclusión dinámica se estableció para colocar cualquier pico de la relación m/z seleccionado en una lista de exclusión durante 45 s después de una sola MS / MS. Todos los espectros MS / MS fueron comparados con las proteínas disponibles, descargadas de Uniprot o de NCBI el 9 de octubre de 2012 o el 20 de junio de 2013, respectivamente, utilizando el programa Thermo Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos disponible en UniProt (UniProt Consortium, 2018), considerando un índice Mascot máximo como factor adicional de identificación, al pI y masa de la proteína.

5.4 Bioensayo de siembra en sustrato

Para llevar a cabo este experimento se imbibieron las semillas en la suspensión del nanomaterial: grafeno 1000 mg L^{-1} adicionando 0.01 % de bionex, solución control (agua +bionex); en el caso del bioensayo con NPs CuO, la imbibición se realizó con la suspensión de 25 y 250 mg L^{-1} , además de la solución control (H_2O); siguiendo el proceso previo de imbibición de las semillas durante 36 h realizado en la prueba de germinación. Una vez emergida la radícula, se realizó el transplante de las plántulas a contenedores de 0.5 L para monitorear su crecimiento hasta los 25 dde. Posterior al transplante se hizo una segunda aplicación de grafeno (1 mL) al aparecer las primeras hojas verdaderas y una tercera a los 25 d.d.e; a partir de esta última se inició la toma de muestras para las pruebas asociadas al estrés oxidativo, considerando como tiempo de referencia para la primera toma 0 h (25 dde.) y 12 h posteriores a la aplicación del nanomaterial.

En el caso del bioensayo con NPs CuO, la segunda aplicación vinculada a la aparición de las hojas verdaderas inició la aspersión semanal de la suspensión de NPs CuO dirigida al follaje como fuente de este micronutriente (Cu), haciéndola hasta los 25 dde.; momento en el cual se hizo la última aspersión y se inició la toma de muestras para las pruebas asociadas al estrés oxidativo. El sustrato utilizado estuvo compuesto por una proporción volumétrica 1:1 turba / zeolita. Las condiciones en las cuales se realizó el bioensayo fueron controladas dentro de una cámara de crecimiento (Equitec) a 25 ± 2 ° C y un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad, con un riego cada tercer día.

Fertilización bioensayo con grafeno: Completa (Ferti drip 20-20-20+ microelementos) dos veces por semana a partir de la aparición de primeras hojas verdaderas.

Fertilización bioensayo con NPs CuO: Hoagland modificada (sin fuente de Cu) dos veces por semana a partir de la aparición de primeras hojas verdaderas.

Los datos obtenidos de este bioensayo permitieron analizar, por un lado, los efectos morfo-fisiológicos provocados por los NMs (grafeno y NPs CuO) y por otro, evaluar la respuesta bioquímica asociada al estrés oxidativo con respecto al tiempo (0 y 12 h), a través de variables como el contenido de peróxido de hidrógeno, actividad enzimática antioxidante, contenido de prolina y clorofila (siguiendo su metodología descrita en el apartado de pruebas asociadas al estrés oxidativo).

5.4.1 Parámetros morfo-fisiológicos

Para percibir los efectos inducidos por los NMs en las plantas crecidas en sustrato, se registraron los cambios sobre variables con relación a la morfología de las plantas, además de otras con referencia a la fisiología que guardan los principales órganos (tallo, hojas y raíz) de las plantas de *C. pepo*. Como parte de las primeras, se plantearon:

- Longitud de raíz (cm).
- Altura de vástago (cm).
- Número de hojas.
- Área foliar (cm²).
- Diámetro de tallo (mm).

Y como variables referentes a la fisiología, se determinaron: la biomasa del vástago y de la raíz (mg), además del índice relativo de clorofila (IRC); el cual se obtuvo mediante una estimación óptica, no destructiva,

basada en la diferencia entre la absorbancia del espectro rojo a 650 nm y el infrarrojo cercano a 940 nm utilizando el aparato SPAD-502 (Brownsville, USA, 2013). Considerando 5 repeticiones por cada tratamiento.

5.4.2 Diseño experimental y Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con 5 repeticiones para cada una de las 5 pruebas (morfo-fisiológica, peróxido de hidrógeno intracelular, enzimas antioxidantes, prolina, clorofila). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de student (0.05) para el bioensayo con grafeno y mediante un ANOVA para el bioensayo con NPs CuO, utilizando en ambos casos el programa INFOSTAT (2017).

6. Resultados y Discusión

6.1 Respuestas fisiológicas y bioquímicas de *Cucurbita pepo* asociadas al efecto del grafeno

6.1.1 Ensayos de germinación estándar

Se determinó el efecto del grafeno en la calidad fisiológica de la semilla de calabacita (*C. pepo*) bajo diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg L⁻¹), mediante el análisis de los cambios inducidos por este nanomaterial, reflejados en su vigor, porcentaje de germinación y morfología de las plántulas. En la primera evaluación (4 dds.) (ISTA 2014), se encontró un mayor desarrollo radicular de las semillas del tratamiento con 1000 mg L⁻¹ de grafeno con respecto a las semillas control (Figura 7).

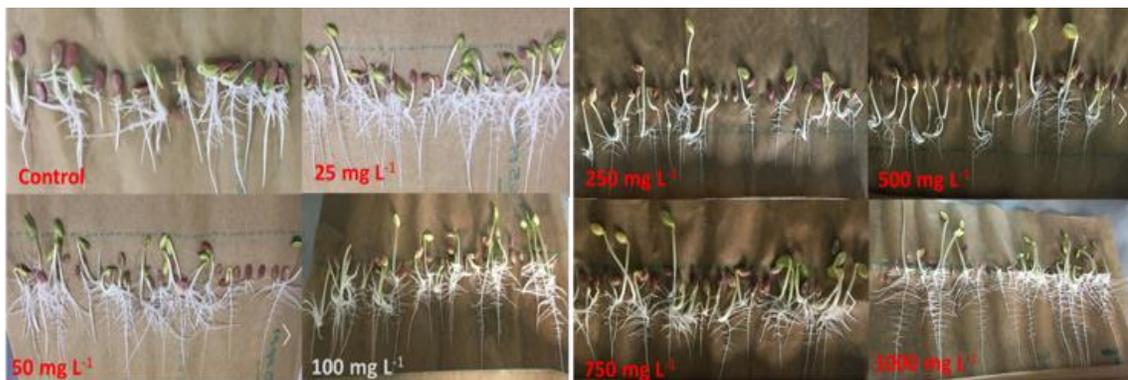


Figura 7. Semillas de *Cucurbita pepo* imbibidas en las diferentes suspensiones de grafeno. Primera evaluación después de 4 días de siembra.

Además, estas raíces presentaron una mayor densidad de pelos radiculares (Figura 8) con respecto al resto de los tratamientos, siendo estructuras de gran interés agronómico dada su función de ingresar tanto agua como nutrientes a la planta, dónde el número de éstos pelos radiculares determinará la proporción de área de contacto que tenga la planta con el suelo y por ende, el grado de eficiencia con que se lleven estos procesos, especialmente en aquellos casos en los que se cuente con un coeficiente de difusión bajo (Lynch, 1995; López-Bucio *et al.*, 2003).

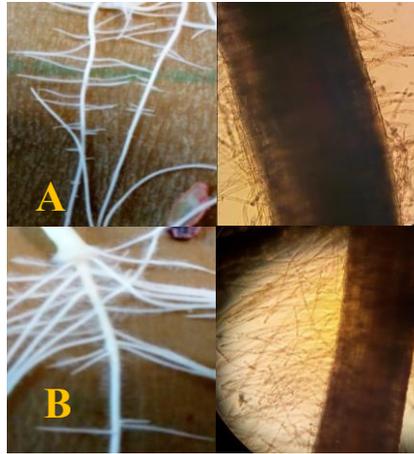


Figura 8. Comparación de las raíces de plántulas *Cucurbita pepo*.
a) Raíces de semillas sin tratamiento; **b)** tratadas con 1000 mg de grafeno L⁻¹. Fotografiadas convencionalmente y bajo microscopio (60 x).

En la segunda evaluación realizada a 8 dds., donde se determinó el porcentaje de germinación, fue posible observar un incremento en esta variable con la aplicación en una dosis de 50 mg L⁻¹ (Cuadro 2; Duncan 0.05), mostrando una mejor respuesta (100 %) en el proceso, incrementando en un 6.4 % la tasa de germinación con respecto al tratamiento control (ANOVA; $p < 0.05$); aunado a esto, fue apreciable un desarrollo más acelerado en las plántulas del tratamiento de 1000 mg L⁻¹ en comparación con el resto de los tratamientos, incluyendo al control (Figura 7). En semillas de espinaca se reportó un efecto similar en donde se evaluó el efecto del grafeno en su forma oxidada (OG) y se observó además de un incremento en la tasa de germinación, mayor velocidad en este proceso (400 y 800 mg de OG L⁻¹), los autores hipotetizan que puede ser debido al tipo de hibridación orbital que se presenta en su estructura (sp^2 y sp^3), el cual facilita y promueve el transporte de agua dentro de la semilla (He *et al.*, 2018). Sin embargo, es importante considerar de forma adicional el estímulo generado por el incremento en la producción de H₂O₂ y otras ERO que impactan en el metabolismo tanto del ácido abscísico (ABA), como del giberélico (AG); fitorreguladores involucrados directamente en el proceso de germinación (El-Maarouf *et al.*, 2015; Yin, 2018). El H₂O₂ tiene la capacidad de oxidar al ácido abscísico para favorecer el incremento en la concentración de AG y con esto, la germinación (Martin *et al.*, 2010). Al incrementar la concentración de grafeno, la tendencia observada fue una disminución en el porcentaje de germinación, la cual pudo ser ocasionada por la transición sobre la condición de estímulo hacia una de estrés oxidativo, debida al incremento incompensable en la cantidad de H₂O₂ (Apel *et al.*, 2004), llegando a un punto deletéreo, en el cual, un mayor número de semillas no lograron concretar con éxito las 3 fases de la germinación (Bewley *et al.*, 2013; He *et al.*, 2018).

En el largo de raíz (LR), se presentó una tendencia de aumento con las concentraciones de 25 y 50 mg L⁻¹ (198.9 ± 2 y 208.6 ± 2.7 mm, respectivamente) comparadas con el control (192.1 ± 0.23 mm). Las raíces bajo el tratamiento de 50 mg L⁻¹ de grafeno tuvieron un 9.0 % de mayor longitud (208.6 ± 2.7 mm; p < 0.01) en comparación con el control (192.1 ± 0.23 mm). El incremento en la concentración de grafeno a partir de la dosis de 100 mg L⁻¹, disminuyó la longitud de las raíces, sin observarse un patrón definido. El incremento en la longitud de la raíz tiene lugar debido a un aumento en el número de células, o la elongación de un número determinado de ellas (Sahi *et al.*, 2018). Los principales metabolitos y biomoléculas, involucrados en estos fenómenos son: fitorreguladores, ERO o de nitrógeno y proteínas (Gupta *et al.*, 2015; Naser *et al.*, 2016). Investigaciones recientes han encontrado que el OG tiene efectos significativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, influenciados por la concentración del NM y el genotipo en estudio (Ayđın, 2016). Se han reportado resultados que inclusive, dosis bajas de este NM (OG), pueden inducir a alteraciones en esta variable, debidas al impacto sobre el contenido de ácido indol acético (AIA) (involucrado en la modulación del crecimiento de la raíz (Ma *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2018). Destacando la correlación directa existente entre la biosíntesis de auxinas en las raíces y el número de raíces secundarias (Qin, *et al.*, 2005; Staswick *et al.*, 2005), esperando la sobreexpresión de proteínas relacionadas en la ruta metabólica de este fitorregulador. De manera directa, el contenido de este fitorregulador en los tejidos no fue contabilizado por lo que se recomendaría realizarlo en un estudio posterior. En el caso de la reducción en la longitud de la raíz puede deberse a una acumulación del NM en la epidermis radicular que genera una desregulación osmótica y hormonal que inhibe la elongación celular y altera su patrón regular de división (Shen *et al.*, 2018).

En cuanto a una variable de importancia fisiológica, la biomasa radicular; hay que tener en cuenta que de forma indirecta va a denotar el tamaño de la raíz (longitud), presencia o ausencia de raíces secundarias y pelos radicales; significando en el presente bioensayo una correlación entre el largo de la raíz con el contenido de biomasa (r = 0.8) en casi todos los tratamientos, con excepción del tratamiento de 1000 mg L⁻¹, donde por el promedio del largo de su radícula, se hubiese esperado un registro de biomasa cercano a los 250 mg, sin embargo, su capacidad de acumulación se vio reducida (193.64 ± 11.78 mg). La respuesta diferencial entre los tratamientos fue altamente significativa (p < 0.01), encabezada por las plántulas del tratamiento de 50 mg L⁻¹, con un contenido de biomasa promedio de 397.78 ± 20.73 mg y en contraste, bajo el tratamiento de 1000 mg L⁻¹ se registraron las menores acumulaciones de 193.64 mg en promedio. La inhibición en el crecimiento de la raíz y su contenido de biomasa puede deberse a una saturación de grafeno en las células epidérmicas o en las vellosidades radicales que da lugar a una sobreproducción de H₂O₂ y a un episodio de estrés oxidativo inhibitorio de procesos anabólicos (Zhao *et al.*, 2015).

En el largo de la plúmula (LP) se obtuvo una respuesta altamente significativa ($p < 0.01$), donde el tratamiento de 1000 mg L^{-1} fue el que destacó, al incrementarse en altura un promedio de 8.5 % más ($139.1 \pm 10.8 \text{ mm}$) con respecto al control ($128.1 \pm 2.4 \text{ mm}$; Cuadro 2). Sin embargo, en la acumulación de biomasa la tendencia no se sostuvo y las plántulas con una mayor acumulación fueron aquellas bajo el tratamiento de 750 mg L^{-1} ($1,287.50 \pm 42.50 \text{ mg}$) en comparación con el control ($1,020.00 \pm 48.08 \text{ mg}$; Cuadro 2-N.S.). Chen *et al.* (2018) reportan que la aplicación de grafeno va a estimular la acumulación de biomasa, porque incrementa la actividad fotosintética e incrementa la longitud de las plántulas. He *et al.* (2018) reportaron que la dosis con la que se obtenía un resultado positivo en plantas de espinaca era de 50 mg L^{-1} (OG) en ambos casos de forma similar a lo expuesto por Shen *et al.* (2018) la alteración de los patrones de crecimiento derivada de la aplicación de grafeno y OG se debía a la incidencia directa de estos NM sobre el contenido de AIA y su metabolismo.

Cuadro 2. Respuestas morfológicas de plántulas de *Cuburbita pepo* cuya semilla fue imbibida en suspensiones de grafeno a diferentes concentraciones.

[Grafeno]	Germinación (%) [*]	LR ^{**} (mm)	Biomasa (radícula) ^{**} mg	LP ^{**} (mm)	Biomasa (plúmula) mg	Vigor (%)
0 mg L ⁻¹ (Control)	94 ± 2.58 ab	192.1 ± 0.23 ab	228.33 ± 15.17 c	128.1 ± 2.4 c	1020.00 ± 48.08 b	89.00 ± 1.91 ab
25 mg L ⁻¹	98 ± 1.15 ab	198.9 ± 2 ab	398.00 ± 23.32 a	125.9 ± 2.5 c	1080.00 ± 35.64 ab	86.00 ± 5.29 ab
50 mg L ⁻¹	100 a	208.6 ± 2.7 a	397.78 ± 20.73 a	125.6 ± 2.6 c	1096.67 ± 43.33 ab	92 ± 2.83 a
100 mg L ⁻¹	97 ± 1.91 ab	187.8 ± 4.2 c	310.00 ± 16.05 b	116.8 ± 3.1 bc	1025.83 ± 70.61 b	79 ± 9.15 bc
250 mg L ⁻¹	69 ± 1.91 c	128.6 ± 3 f	217.88 ± 22.59 c	96.3 ± 3.2 c	1019.75 ± 41.80 b	72 ± 9.93 bc
500 mg L ⁻¹	86 ± 5.29 bc	146.3 ± 4.4 e	217.86 ± 12.27 c	120.8 ± 3.3 bc	1089.29 ± 38.46 ab	69 ± 5.97 c
750 mg L ⁻¹	91.2 ± 2.33 bc	169.5 ± 5.4 d	241.33 ± 2.4 c	131.6 ± 2.8 b	1287.50 ± 42.50 a	82.4 ± 2.71 ab
1000 mg L ⁻¹	92.8 ± 1.5 ab	183.9 ± 6.1 dc	193.64 ± 11.78 cd	139.1 ± 10.8 a	1089.76 ± 41.71 ab	87.2 ± 1.96 ab

Valores de medias y E.E con literales diferentes en la misma columna denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos. **: $p < 0.01$. LR: longitud radicular; LP: longitud de plúmula. Se consideraron 5 repeticiones; N = 400.

La aplicación de grafeno durante la imbibición de las semillas dio lugar a una disminución del porcentaje de vigor ($69 \pm 5.97 \% V$) en el tratamiento con 500 mg L^{-1} de grafeno, con respecto al control ($89.00 \pm 1.91 \% V$). Con una dosis de 50 mg L^{-1} el porcentaje de vigor tuvo un incremento numérico sin mostrar diferencias significativas con respecto al control. Por lo que se puede decir que no hubo una mejora significativa en la calidad de semillas debida a la exposición con grafeno. De acuerdo con los cambios morfológicos observados en las raíces de las semillas germinadas bajo el tratamiento de 1000 mg L^{-1} de grafeno. De acuerdo con resultados obtenidos, al no haber cambios estadísticos significativos, pero si cambios morfológicos notorios en las raíces de las semillas germinadas bajo el tratamiento de 1000 mg L^{-1} de grafeno (Figura 8), se decidió realizar los análisis proteómicos en esta concentración.

6.1.2. Eventos bioquímicos asociados a la aplicación de grafeno

Con el objetivo de poder establecer una relación entre los cambios morfofisiológicos en la raíz generados por la exposición a grafeno (1000 mg L^{-1}), se analizaron variables involucradas con la producción de ERO para comprobar si estos cambios se encontraban inducidos por un estado de estrés, para ello, se tomaron las plántulas de las semillas imbibidas con la suspensión de 1000 mg L^{-1} siete días después de la siembra y otras que sólo fueron imbibidas en agua + bionex (control).

En primer lugar se registró de manera cualitativa el estímulo oxidativo derivado de la producción de H_2O_2 (generado por el grafeno bajo la dosis de 1000 mg L^{-1}); distinguiéndose tras el ensayo histoquímico con DAB (estimación cualitativa) que en las raíces del tratamiento con grafeno (1000 mg L^{-1}) hubo una sobreproducción de H_2O_2 reflejada en una mayor formación de regiones color café (depósitos de H_2O_2), siendo visiblemente mayores en los puntos apicales tanto de las raíces primaria y secundarias tratadas con grafeno en comparación con las raíces control (Figura 7). Cuantitativamente esta diferencia significó un incremento del 90 % en la acumulación de H_2O_2 intracelular en el tejido radicular de *C. pepo* bajo tratamiento con grafeno ($0.167 \pm 0.019 \mu\text{mol}$), en comparación con el tejido control ($0.088 \pm 0.007 \mu\text{mol}$; $p < 0.01$). Condición similar ha sido reportada por Zhao *et al.* (2015) y Rico *et al.* (2015), donde la sobreproducción de H_2O_2 fungió como segundo mensajero en un mecanismo de señalización para la activación de diversas rutas metabólicas de síntesis o inhibición de algunos fitorreguladores (AIA, ABA, etc.) derivando en cambios morfológicos en la raíz, promoviendo un mayor número de raíces secundarias y/o mayor densidad de pelos radicales, para así lograr su adaptación a las nuevas condiciones imperantes ante la presencia de NMs derivados del carbono. La intervención del H_2O_2 en la alteración de la arquitectura radicular deriva en la formación de estas estructuras (raíces secundarias y pelos radicales) y mantiene estrecha relación y coordinación con las auxinas (Correa-Aragunde *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014; Mei *et al.*, 2017), siendo el H_2O_2 el activador de la expresión de genes responsables de la formación de las raíces

laterales (Chen *et al.*, 2018a; Mei *et al.*, 2017). Variaciones en los niveles de ERO bajo la condición diferencial espacio-tiempo, van a impactar en los patrones de crecimiento y desarrollo de la planta; mantener sus niveles dentro de un rango óptimo promueve una condición, además de saludable para la planta, con mayor capacidad de adaptación a entornos no favorables. Para ello, no deben exceder el límite del umbral bioquímico funcional, dependiendo de la distribución adecuada de electrones en el medio según una disponibilidad mínima o máxima aceptable (contrarrestable) y los niveles citotóxicos, valiéndose de la activación de rutas metabólicas que culminan con la síntesis de compuestos antioxidantes, como los polifenoles (Mittler, 2017).

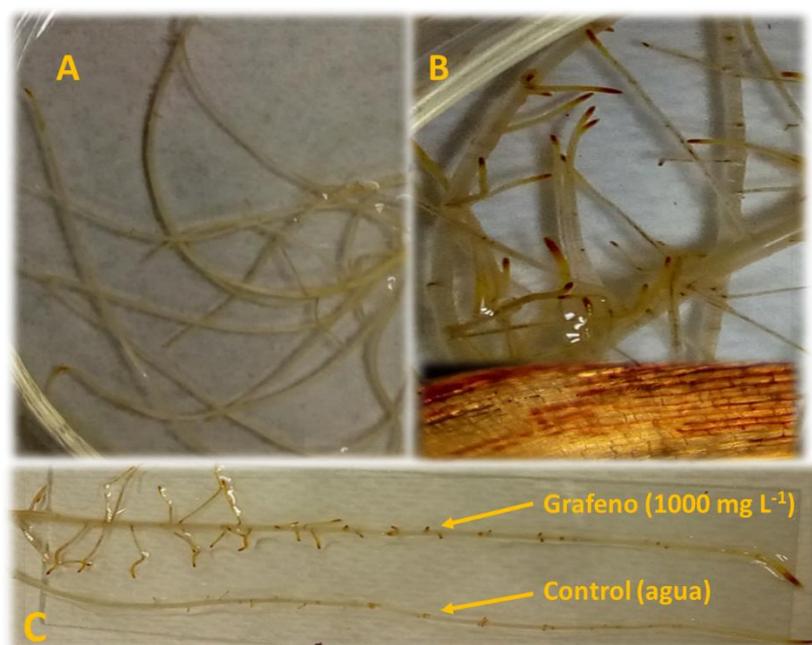


Figura 9. Depósitos de peróxido de hidrógeno en raíces de *Cucurbita pepo*.

- a) Raíces de plántulas sin tratamiento; b) Raíces de plántulas tratadas con grafeno; c) Alteración en la estructura radicular derivada de la aplicación de grafeno.

El estímulo generado por el grafeno (1000 mg L^{-1}) y la sobreproducción de H_2O_2 en la raíz a los 7 dds., impactó de forma simultánea en la síntesis de metabolitos secundarios antioxidantes (fenoles; Cheynier, 2012; Vera *et al.*, 2015), donde en las raíces elicidadas se produjo una mayor acumulación de estos compuestos ($112.87 \pm 4.38 \text{ } \mu\text{g}$ de catequina /gPS) equivalente a un 28 % de incremento (T de student; $p < 0.01$), con respecto al contenido en las raíces control ($80.95 \pm 4.38 \text{ } \mu\text{g}$ de catequina /gPS).

Los compuestos fenólicos pueden, tanto eliminar ERO, como inhibir su formación en los diferentes compartimientos celulares bajo estrés, para poder proteger a las plantas de los potenciales daños derivados

de su persistente presencia (Dixon *et al.*, 2002). Unos de los polifenoles con intervención más activa ante la presencia de H₂O₂ son los flavonoides y los fenilpropanoides, los cuales, son principalmente oxidados por las peroxidases para la eliminación de H₂O₂ (Jovanović *et al.*, 2018). Sin embargo, debe quedar como antecedente que la inducción del metabolismo fenólico en las plantas tiene lugar como respuesta a múltiples tipos de estrés de naturaleza tanto biótica como abiótica (Kähkönen *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2014).

Ghorbanpour *et al.* (2015) reportaron en su trabajo con plantas de *Satureja khuzestanica* que su interacción con un NM derivado de carbono incrementó de forma significativa la concentración de algunos fenoles como ácido rosmarínico, caféico, y flavonoides; los cuales pueden involucrarse directamente en funciones antioxidantes, como agentes reductores como parte de una respuesta antioxidante más integral en coordinación con POX (Corpas *et al.*, 2017). Un incremento en la concentración de compuestos fenólicos puede dar lugar a la resistencia por parte de la planta ante la presencia de hongos fitopatógenos, marcando con esto una potencial línea de investigación para la aplicación de grafeno en especies vegetales en un futuro cercano (Suriyaprabha *et al.*, 2014).

6.1.3. Proteómica diferencial e identificación de las proteínas

Previo a realizar la electroforesis cualitativa (patrón proteico en una dimensión-masa; SDS-PAGE), se confirmó que la calidad y cantidad de proteína eran adecuadas para continuar con el trabajo de proteómica, al contar con un promedio de 1 mg de proteína mL⁻¹ en cada una de las muestras. Este patrón (Figura 10) también ayudó a predecir el rango de masas moleculares en el cual se encontraba el mayor número de proteínas, resultando de utilidad para la consideración del tiempo de corrida de la electroforesis 2-D SDS (PAGE) para finalmente, lograr vislumbrar de manera más integral los eventos bioquímicos y fisiológicos activados y su posible conexión con una ruta metabólica en particular, tras la interacción de los tejidos radiculares con el grafeno mediante el análisis del perfil proteómico de las raíces provenientes de las semillas expuestas a la suspensión con este NM (1000 mg L⁻¹ de grafeno), después de 7 días de haber germinado.

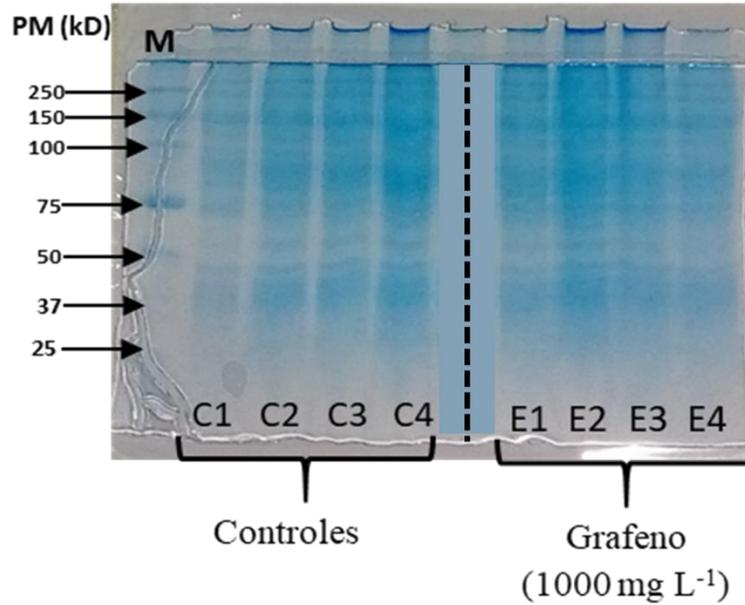


Figura 10. Perfil proteico de extractos de raíz de *Cucurbita pepo*

C: extracto proteico de las raíces control; E: extracto proteico de raíces bajo tratamiento con grafeno; de Gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 % de acrilamida, tinción azul de Comassie coloidal (BioRad).

Para analizar el perfil proteómico en sus dos dimensiones se evaluaron dos gradientes inmovilizados de tiras de pH (IPG-strips) de 3-10 y de 4-7 con longitud de 7 cm (Ver Anexo: A.8. y A.9.), con el objetivo de desplegar el patrón de proteínas en el rango que permitiera la mejor resolución posible resultado de una óptima separación. Como resultado, el proteoma obtenido en 2-D SDS-PAGE de las raíces de las muestras control y aquellas provenientes de una semilla imbibida en suspensión de 1000 mg de grafeno L⁻¹ tuvo mejor separación y resolución empleando tiras de pH inmovilizado dentro de un rango de 4-7 (Figura 11). Sin embargo, para poder tener una mayor resolución, se incrementó el tamaño de la tira a 11 cm para los ensayos sucesivos.

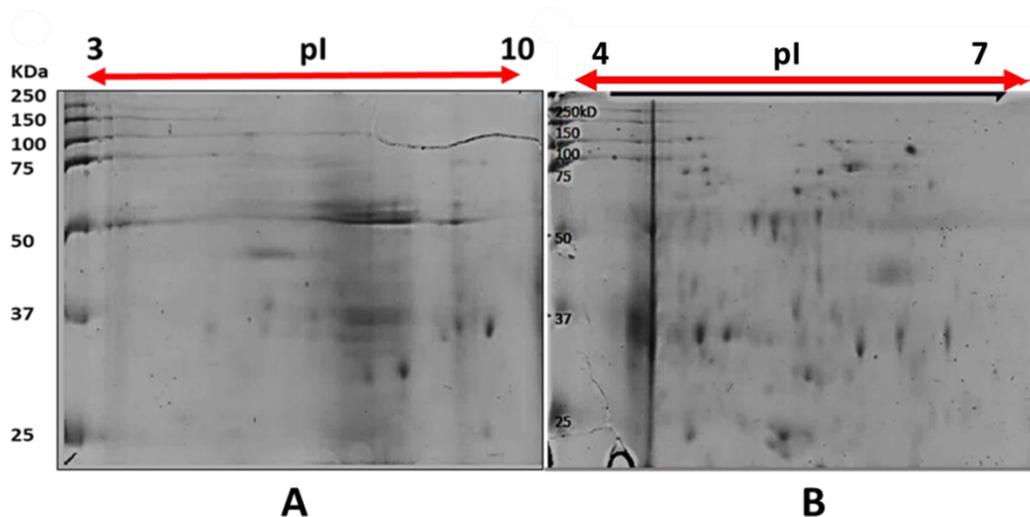


Figura 11. Perfil proteómico en dos dimensiones de raíces de *Cucurbita pepo*.
Tiras de isoelectroenfoque (IPG) de 7 cm de largo; a) pH 3-10; b) IPG con pH 4-7.

Tras el isoelectroenfoque (1-D) se obtuvieron ocho tiras, cuatro correspondientes a cada repetición de un mismo tratamiento (control y 1000 mg L⁻¹ de grafeno), anotando que en ninguna de las electroforesis se rebasó los 50 mA, lo que indicó que las muestras no presentaban contaminación por compuestos iónicos residuales. Cada tira fue sometida a 2-D SDS PAGE, dando lugar a 8 geles con un patrón proteómico característico para cada tratamiento.

Para evitar el desplazamiento no deseado de las proteínas (manchas) contenidas en el gel al momento de estar en agitación, éstos se fijaron con una solución de metanol y ácido acético glacial y posteriormente, teñidos con solución fluorescente *Sypro Ruby* (Bio rad), cuya mayor sensibilidad permitió la detección de proteínas con una menor concentración, reflejándose en un número mayor de manchas (proteínas); finalmente al cabo de 12 h de permanecer en la solución de tinción, los geles se sometieron a un proceso de lavado, previamente a ser foto-documentados (Kodak Digital Science Image Station 2000R) para realizar su análisis estadístico (programa informático PD Quest 2-D Analysis-Bio Rad).

En la Figura 12 se muestran los perfiles proteómicos de la muestra control y de la muestra de raíz tratada con grafeno. En total se contabilizaron 853 ± 13 manchas proteicas comunes en ambos perfiles (control y grafeno); y como manchas exclusivas en el perfil obtenido de las raíces elicitadas con grafeno se contabilizaron 135 ± 16 (determinadas como diferenciales con respecto al control; $p < 0.05$; Figura 12).

El gel de referencia (máster gel) contenía 1,580 manchas proteicas en total (patrón proteómico que albergaba las machas más representativas de cada tratamiento) con las cuales se hizo la comparación cuantitativa y estadística (t de student al 95 %) con cada una de las repeticiones de ambos tratamientos. De las 135 manchas proteicas propias del perfil proteómico obtenido de las raíces elicidadas con grafeno, 35 se encontraron sobre-expresadas al menos 1.5 veces en los geles correspondientes al tratamiento con grafeno (Figura 12) y se enviaron a secuenciar.

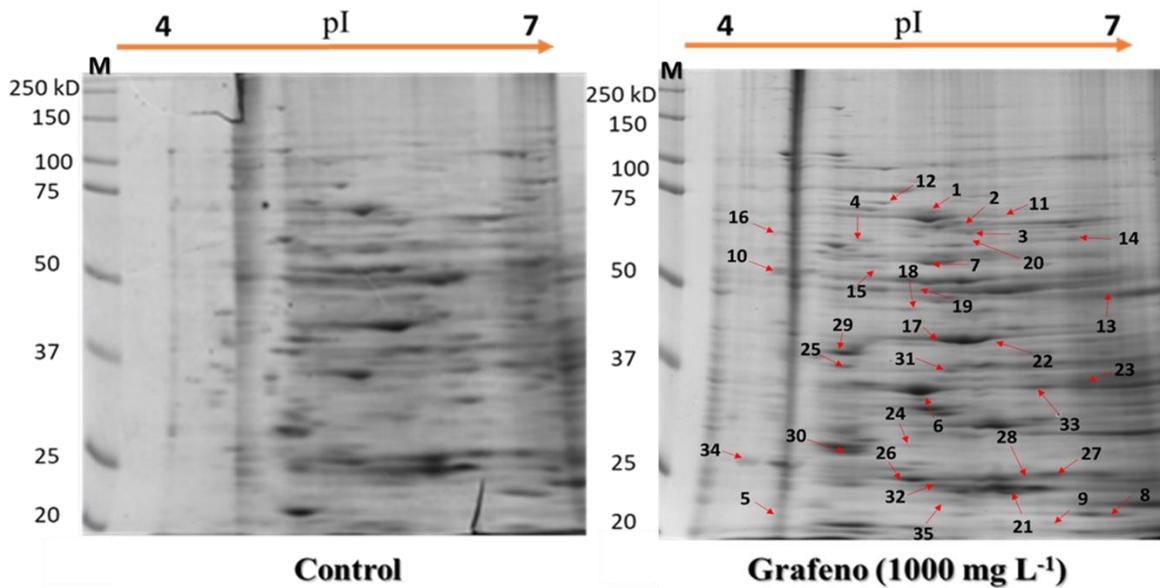


Figura 12. Perfil proteómico diferencial de raíces de *Cucurbita pepo*.

Las proteínas sobre-expresadas que se enviaron a secuenciar, fueron identificadas mediante su secuencia peptídica, se utilizó como parámetro de validación el punto isoelectrico (pI) y peso molecular (PM) experimental de cada una de las manchas; el valor asignado para cada mancha es la intersección entre el pI y el marcador de PM. En el Cuadro 3 se muestran las proteínas obtenidas y clasificadas por su función dentro del metabolismo celular.

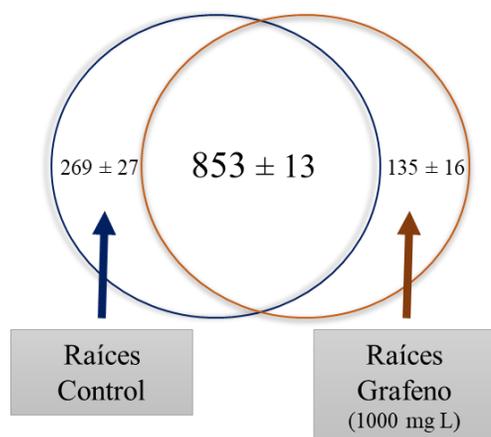


Figura 13. Diagrama de Venn de las proteínas expresadas en raíces de *Cucurbita pepo* bajo estrés con grafeno.

Las proteínas sobreexpresadas en la raíz de calabacita indicaron un patrón metabólico más activo en búsqueda del mantenimiento y restablecimiento de la homeostasis celular, a través de una sobreexpresación de procesos como el transporte de agua y solutos a través de las membranas (Cuadro 3), alteración de la estructura de la pared celular, el equilibrio redox, señalización, glucólisis, fosforilación oxidativa, síntesis/ preservación de proteína; y en general, pudo percibirse una dinámica en búsqueda de un incremento en el estado energético en la célula (producción de ATP y poder reductor).

Cuadro 3. Proteínas identificadas de las raíces de *Cucurbita pepo* bajo estrés por grafeno.

Mancha	Proteína	Número Acceso	Masa ^e	pI ^e	Masa _t	pI _t	Organismo	Secuencia
<i>Transporte de agua y solutos a través de la membrana</i>								
5	Aquaporina NIP3-2	Q7EYH7	16.82	4.5	31.83	7.39	<i>Daucus carota</i>	MEGGKMSSMGM DAASASVTVPPMQ MQAGDQSNR
2	V-ATP-asa subunidad catalítica A	P09469	67.94	5.51	68.79	5.45	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	KVSGPVVVADG MGGAAMYELVR VSGPVVVADG MGGAAMYELVR NIIHFYNLANQAVER DTVLELEFQGVK EDDLNEIVQLVGK EASIYTGITIAEYFR
<i>Modificación de la pared celular</i>								
17	UDP-arabinopiranososa sintasa mutasa 1	O04300	40.06	5.3	41.55	6.07	<i>Pisum sativum</i>	MASLPKPTPLL KDELDIVIPTIR ELIGPAMYF GLMGDQPIGR
24	Caffeoyl-CoA O-metil transferasa 3	O24150	22.78	5.18	27.22	5.49	<i>Nicotiana tabacum</i>	YYRDFVLELNK VGGHIGYDNTLWNG SVVAPPDAPLRK VGGHIGYDNTLWN GSVVAPPDAPLR DFVIELNK EGPALPVLQDM IEDGK IEFKEGPALP VLDQMIEDGK
3	Actina-7	P53492	65.31	5.56	41.71	5.49	<i>Arabidopsis thaliana</i>	VAPEEHPVL LTEAPLNPK

								LAYVALDY
								EQELETAK
								NYELPD
								GQVITIGAER
33	Actina-51	Q96483	30.5	6.1	37.15	5.44	<i>Solanum lycopersicum</i>	DLYGNIVLSG
								GSTMFPGIADR
								SSSSIEKNYEL
								PDGQVITIGAER
								VAPEEHPV
								LLTEAPLNPK
								TTGIVLDSGDGVSHT
								VPIYEGYALPHAILR
19	Actin-54	P93373	75.37	5.9	37.46	5.99	<i>Nicotiana tabacum</i>	SSSSIEKNYELP
								DGQVITIGAER
								VAPEEHPV
								LLTEAPLNPK
								DLYGNIVLSG
								GSTMFPGIADR
18	Tubulina α -1	P46259	51.32	5.35	49.62	5.06	<i>P. sativum</i>	IHFMLSS
								YAPVISA EK
								AVFVDL
								EPTVIDEVR
								QLFHPEQLISG
								KEDAANNFAR
								LVSQVISSLTASLR
10	Tubulina β -2	P33631	56.28	4.47	46.18	4.98	<i>Anemia phyllitidis</i>	NSSYFV
								EWIPNNVK
								MMLTFSVFPSPK
								LAVNLIPFPR
								LAVNLIPFPR
4	Proteína homóloga de control de tumores	Q2PS27	65.61	5.06	19.03	4.69	<i>Cucurbita maxima</i>	VVDIVDTFR
								EGATDPT
								FLYLAPALK

Proceso de óxido reducción y señalización								
7	ATP sintasa subunidad β	P17614	59.43	5.59	59.82	6.34	<i>Nicotiana glauca</i>	EAPAFVEQA
								TEQQILVTGIK
								QISELGIYP
								AVDPLDSTSR
								IPSAVGYQPT
								LATDLGGLQER
								TVLIMELINNVAK
VGLTGLTVAEHFR								
11	Proteína de choque térmico	P26413	76.5	5.42	70.835	5.49	<i>Glycine max</i>	NAVVTVPAYFNDSQR
								SINPDEAVAYGAAVQAAILGOGI
								IINEPTAAAIAYGIDKK
								IINEPTAAAIAYGIDK
ITITNDKGR								
14	Malato descarboxilasa dependiente de NADP	P12628	65.64	6.25	64.892	6.86	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ALEYADFDKFR
								ALEYADFDKFRVR
								SGYFNPQMEEYVEIPSDSGITFNVQPK
22	Proteína quinasa 3- mitógeno activado	Q39023	37.38	5.82	42.69	5.97	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DLKPSNLL
								LNANCDLK
								QFSDVYISTE
								LMDTDLHQIIR
2	ATP-asa tipo V subunidad catalítica A	P09469	67.94	5.51	68.79	5.45	<i>Daucus carota</i>	KVSGPVVVADG
								MGGAAMYELVR
								VSGPVVVADG
								MGGAAMYELVR
								NIIHFYNLANQAVR
								DTVLELEFQGVK
								EDDLNEIVQLVGK
EASIYTGITIAEYFR								
9	Superóxido dismutasa	P09233	16.75	6.23	25.53	7.71	<i>Zea mays</i>	MNAEGALQG
								SGWVWLALDK

								AASILSSHDPVILAK
								LAPEYEKAASIL
16	Proteína disulfuro (isomerasa)	Q9XF61	58.24	4.46	57.05	4.93	<i>Datisca glomerata</i> (Durango root)	SSHDPVILAK
								VVVADSLDEIVFKSGK
								GPRDADGIVDYLLK
35	Tiorredoxina H1	P29448	18.96	5.41	12.67	5.92	<i>A. thaliana</i>	SVASDWAI
								QAMPTFMFLK
19	Glutamato decarboxilasa	Q07346	51.06	5.27	56.69	5.71	<i>Petunia hybrida</i>	NYVDMDE
								YPVTTELQNR
								FGWIVPAYTM
								PPNAQHITVLR
23	Malato deshidrogenasa	O24047	29.95	6.72	35.48	6.43	<i>M. crystallinum</i>	VLVTGAAGQIG
								YALVPMIAR
								VLVTGAAGQIG
								YALVPMIAR
								VLVVANPANTNAL
								ILKEFAPSIPEK
26	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 8 Fe-S	P80269	18.61	5.27	26.36	5.58	<i>Solanum tuberosum</i>	LLENGDRW
								ETEIAENLR
								LLENGDRW
								ETEIAENLR
								LCEAICPAQAI
								TIEAEEREDGSRR
								LCEAICPAQAI
								TIEAEEREDGSR
15	Fosfoglicerato mutasa/ 2,3-bisfosfoglicerato-independiente	P30792	50.17	6.87	60.582	5.53	<i>Zea mays</i>	LDQLQLLK
								YAGMLQYDGEKLP
								VNLPNGDMVGHTGDIETVVACK
8	Inosin trifosfato pirofosfatasa	Q8L968	16.91	6.55	22.46	6.79	<i>A. thaliana</i>	SLKLDLPE
								LQGEPELISK
								SLKLDLPEL
								QGEPELISKEK

Síntesis/ preservación y degradación de proteínas

31	Cisteína sintasa	Q00834	42.04	5.59	34.17	5.62	<i>Spinacia oleracea</i>	AEEIRDKTPNSY ILQQFENPANPK DKTPNSYIL QQFENPANPK
30	Proteína 14-3-3-GF14-C	Q6ZKC0	22.16	4.91	28.808	4.84	<i>O. sativa</i>	MISTSEEIAQVGTSANGEREIGELIAK AAVEEGIVPGGGVALLYASK LLEQDDPDLGYDAAKGEYVDMVK MISTSEEIAQVGTISANGEREIGELIAK AGLQDLAVLTGGQVITEELGMNLEK
12	Regulador RNA polimerasa Subunidad 37 b (transcripción)	Q8H1B3	76.5	5.4	75.1	5.05	<i>A. thaliana</i>	ITPSWVAFTDTER ITPSWVAFTD TERLIGEAAK ETAEAFLGKK NTVIPTKK
6	Proteína ribosomal 60 S P0-1	O04204	29.55	5.61	33.65	5.29	<i>A. thaliana</i>	INKGTVEI ITPVELIK GTVEIITPVELIK INKGTVEI ITPVELIKK GDLKEV SEEVAKYK INKGTVE IITPVELIK GTVEII TPVELIKK GDLKEV SEEVAK
25	Proteína ribosomal 40S	O22518	37.36	5.06	33.89	5.26	<i>Glycine max</i>	RNDGIYIINLGK VIVAIENPQDI IVQSARPYGQR
1	Proteína de choque térmico	P29357	76.46	5.2	71.69	5.48	<i>S. oleracea</i>	NQVAMN PINTVFDAK IINEPTA

									AAIAYGIDKK
									VQQLL
									QDFFNGK
									VQQLL
									QDFFNGK
									NAVVTV
									PAYFNDSQR
									MISTSEEIAQVGTI
									SANGEREIGELIAK
									AAVEEGIVPGGG
									VALLYASK
34	Chaperonina CPN60-1	Q05045	22.16	4.91	28.81	4.84	<i>Cucurbita máxima</i>		LLEQDDPDLGYD
									AAKGEYVDMVK
									MISTSEEIAQVGT
									ISANGEREIGELIAK
									AGLQDLAVLTGG
									QVITEELGMNLEK
									SNYNFEKPFYLYLAR
									YEPTIGVEV
27	Proteína de enlace GTP Ran 1	P38546	18.93	6.23	25.17	6.71	<i>Solanum lycopersicum</i>		HPLDFFTCNGK
									KYEPTIGVEV
									HPLDFFTCNGK
									SPPIEEVIQSGVVPR
20	Importina subunidad α -1 ^a	Q71VM4	60.34	5.37	57.54	5.22	<i>O. sativa</i>		VVIDHGAVPIFVK
									YIGLLATGLTADAR
28	Proteasoma subunidad α tipo 4	P52427	19.71	6.02	27.431	6.6	<i>A. thaliana</i>		ATSALKEQEAINFLEK
									LVQIEHALTAVGSGQTSLGIK
32	Proteasoma subunidad α tipo 2	Q10KF0	18.96	5.41	25.828	5.48	<i>O. sativa</i>		IQSLTPNIGVVYSGMGPDFR
									KLPSILVDETSVQK
									VAAQVDDGPCVT
13	Regulador proteasa 26S-subunidad 7 ^a	P0DKJ9	49.26	6.5	47.65	6.29	<i>O. sativa</i>		YIGEGGSGNFVK
									KVAAQVDDGPC
									VTYIGEGGSGNFVK

6.1.1.1 Transporte de agua y solutos a través de la membrana

Dentro de las proteínas sobreexpresadas se identificó un canal transportador de agua (Aquaporina NIP3-2); esta es una proteína que se puede encontrar en la membrana plasmática o en el tonoplasto. Un registro similar (sobreexpresión), ya había sido reportado en tejidos tratados con un nanomaterial también derivado del carbono (NTCM). Khodakovskaya *et al.* (2013) encontraron una sobreexpresión de aquellos genes relacionados con el transporte de agua (acuaporina-LeAqp2), la extensión de la pared celular y la división celular; en callos de plantas tabaco en contacto con este NM (Kole *et al.*, 2016).

Otra investigación al mismo nivel que coincide en la sobreexpresión de acuaporinas como consecuencia de la elicitación con NMs derivados de carbono; fue la que llevó a cabo Lahiani *et al.* (2013), donde los NTCM indujeron una sobreexpresión en los genes que codificaban para diferentes tipos de estas proteínas transmembranales (membrana celular y tonoplasto) transportadoras de agua en semillas de soya, maíz y cebada (Kole *et al.*, 2016). Los fenómenos promovidos por la sobreexpresión de acuaporinas, derivado de la interacción del grafeno con los tejidos seminales, son: el incremento de su potencial hídrico y turgencia, así como la expansión celular (Lahiani *et al.*, 2013).

6.1.1.2 Modificación de la pared celular

De las proteínas sobreexpresadas que tienen incidencia sobre el órgano más externo (pared celular); se encontraron unas que participan directamente en la expansión (actina) y división celular (tubulina); la biosíntesis de lignina (cafeoyl o-metil transferasa; Ma y Luo, 2015); además de la activación de señales y su transmisión en cascada (actina) hacia los organelos involucrados en la respuesta ante el estímulo/ estrés que el grafeno generó sobre el tejido radicular. La sobreexpresión de la actina, se relaciona directamente con la expansión del citoesqueleto y al tener lugar este fenómeno, la vacuola se ve obligada a reducir su volumen; esta respuesta en particular, es activada en cuanto la membrana plasmática percibe una variación significativa de ácido indolacético (AIA; García *et al.*, 2018). La actina y tubulina, ambas están involucradas con la división, expansión y señalización celular; aunque la primera, también interviene en el transporte de vesículas contenedoras de metabolitos (precursores de azúcares o pectina) vitales para la formación de la pared celular (Trinidad *et al.*, 2016). Una alteración similar en plantas de arroz (*Oryza sativa*) dio lugar a fenotipos tolerantes a un ambiente con baja disponibilidad de agua; tras el análisis proteómico obtenido, se corroboró la sobreexpresión significativa de actina y tubulina; dentro de las características fenotípicas más destacables se encontraron: un mayor crecimiento de raíces y pelos radicales, lo que permitió un mejor

desarrollo de las plantas tolerantes en comparación con el control sin sobreexpresión de estas proteínas (no tolerante; Trinidad *et al.*, 2016).

La cafeoyl CoA metil transferasa 3 (CCoAMT), es una enzima que está involucrada en la síntesis de lignina y ahí radica su importancia para la función y plasticidad de la pared celular; pudiendo distinguir la correlación directa entre la actividad de esta enzima (CCoAMT) y el contenido de lignina de la pared celular, por lo que una disminución en su actividad repercutirá en una reducción significativa del contenido de lignina (Giordano *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2018).

6.1.1.3 Proceso de óxido reducción y señalización

El grafeno en las raíces de *C. pepo* provocó cambios en las proteínas relacionadas con la regulación redox y la alteración de la homeostasis celular (Cuadro 3). Siendo similar el resultado al reportado por Hossain *et al.* (2015) en el análisis proteómico de raíces de *Eruca sativa* bajo exposición de NPs Ag. El estallamiento oxidativo generado sobre la condición redox de la célula, tuvo una repercusión sobre el estado energético a nivel general; el cual, mostró su ajuste, hacia una necesidad metabólica por obtener ATP, GTP u otras formas de poder reductor (NADH^+ , NADPH^+ , FADH^+ , etc.) para recuperar así, las principales formas de energía libre en la célula, mismas que determinan, además de la dirección de las reacciones y su punto de equilibrio, la cantidad de trabajo que se lleva a cabo en los diferentes compartimientos celulares, denotando la prevalencia de reacciones de naturaleza endergónica (Buchanan *et al.*, 2012; Nelson y Cox, 2004).

Las enzimas activadas (sobre-expresadas) relacionadas con este proceso fueron: la ATP sintasa, triosa fosfato isomerasa (TFI), enolasa; la malato deshidrogenasa (Cuadro 3) que interviene, tanto en el ciclo de Krebs, como en el del glioxilato. Y particularmente, en la dinámica de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria (fosforilación oxidativa) que resulta en la síntesis de ATP; se encontró además de la ATP sintasa, la NADH deshidrogenasa (complejo I; Buchanan *et al.*, 2012).

La exposición de las semillas de *C. pepo* al grafeno, indujo la sobre-expresión de la SOD, que puede actuar como señal en las raíces bajo condiciones de estrés, donde se involucran en una ruta de señalización en la que participan activamente canales de calcio, la calmodulina y las MAPK para dirigir el estímulo principalmente al núcleo (Raja *et al.*, 2017); donde los principales cambios asociados a esta ruta están en una variación sobre las concentraciones de AIA y ABA, para inferir en la morfología de este órgano en favor de su adaptación (Buchanan *et al.*, 2012).

Una respuesta alusiva al estrés oxidativo se obtuvo cuando en plantas de *Arabidopsis spp.* se expusieron a NPs Ag; los principales genes sobre-regulados, estaban involucrados en la activación de superóxido dismutasa, peroxidasa y el intercambio de cationes y protones en la vacuola (Kaveh *et al.* 2013). Al año siguiente Nair y Chung (2014) encontraron que las NPs Ag, activaron genes relacionados con la biosíntesis del glutatión y la asimilación del azufre (glutamato-cisteína ligasa, glutatión sintetasa, glutatión S-transferasa, glutatión reductasa, fitoquelatina sintasa, ATP sulfurilasa, fosfosulfato reductasa, sulfito reductasa, cisteína sintasa).

Bajo condiciones de estrés abiótico, la tiorredoxina va a cumplir con otra función adicional, que es su adaptación como una chaperona en la conservación de la estructura cuaternaria de las proteínas que se encuentran formando complejos de bajo peso molecular; los cuales tenderán a formarse cuando se encuentren expresadas las proteínas de choque térmico (que también se encontraron sobreexpresadas en las raíces de *C. pepo*) y que son susceptibles a la dinámica reconfigurativa de las disulfuro reductasas o isomerasas (Rouhier *et al.*, 2015). En su relación con algunos fitoreguladores, la tiorredoxina resulta vital para la transducción de señales activadas por algunos de éstos, en especial, los brasinoesteroides (BR) (Rouhier *et al.*, 2015). La activación de la tiorredoxina funge como estrategia metabólica antioxidante, vinculándose de manera directa con las variaciones espacio-temporales de estas especies en los diferentes organelos (Rouhier *et al.*, 2015).

La tercera enzima involucrada con relación al metabolismo del azufre, tras la alteración del estado redox de las células radiculares, durante la exposición de las semillas de *C. pepo* al grafeno fue la cisteína sintasa; su sobreexpresión, se puede interpretar como un sensor del estado redox celular (Romero *et al.*, 2014), su función está principalmente relacionada con la desintoxicación de la planta, además que se ha encontrado su correlación directa con el desarrollo de pelos radicales (Ma *et al.*, 2018), generando con esto una mayor tolerancia en las plantas expuestas a condiciones de estrés abiótico (Romero *et al.*, 2014; Rashid *et al.*, 2018). También ha quedado demostrada la relación existente entre la producción de cisteína y la senescencia temprana de las plantas evaluadas (Romero *et al.*, 2014), encontrándose patrones morfológicos similares a los en las plántulas de *C. pepo* expuestas al grafeno durante la evaluación realizada a los 7 días (mayor velocidad de crecimiento). Esto aunado con la relación de la tiorredoxina (sobreexpresada) con otras enzimas como las α -amilasas (translocación de nutrientes en tejidos de reserva); las cuales conforman un clúster proteico funcional que favorece una mayor velocidad de germinación y de crecimiento; integrando así, una explicación más robusta, con referencia a las respuestas observadas tras la germinación de las semillas de *C. pepo* tratadas con grafeno (Rouhier *et al.*, 2015).

6.1.1.4 Proteínas relacionadas con el metabolismo de energía y carbohidratos.

Se activaron enzimas del metabolismo primario de las plantas; incrementando el catabolismo de la glucosa y la producción de energía vía fosforilación oxidativa. Dos de las enzimas sobre expresadas cuya importancia se ha comprobado bajo condiciones de estrés, son la TFI y enolasa. La TFI, enzima de ciclo de glucólisis, se encarga de catalizar la interconversión entre triosas (dihidroxiacetona fosfato/DHAP y gliceraldehído 3-fosfato/GAP); y la enolasa, que es la penúltima enzima en participar en este proceso (glucólisis), cataliza la síntesis de fosfoenolpiruvato (FEP) a partir de 2-fosfo-D-glicerato (Buchanan *et al.*, 2012; Nelson y Cox, 2004).

En las raíces de *C. pepo* expuestas al grafeno, la actividad de TFI cobra un papel importante; además de ser parte de la ruta generadora de energía, evita un efecto citotóxico por la formación del metilglioxilato (MG); ya que mientras el sustrato (enediolato) se encuentre en el sitio activo de esta enzima, no pierde su grupo fosfato y con ello, evita la formación de este oxoaldehído que tiene la capacidad de reaccionar con proteínas (glicación) y nucleótidos, modificándolos de forma irreversible, que en un grado crítico puede llevar a la muerte celular (Kaur *et al.*, 2015).

Por otro lado, la sobreexpresión de esta enzima (TFI) ha sido posible correlacionarla de forma directa con la tolerancia a metales pesados, *e.g.* Cd, por parte de *Haematococcus pluvialis* y *Populus spp.* (Kaur *et al.*, 2015); y por otro lado con la tolerancia a la salinidad en raíces de *Oryza sativa*, mostrando una proporción similar en la sobreexpresión de TFI que las raíces de una especie halófila (*Aeluropus lagopoides*; Kaur *et al.*, 2015).

La incorporación del grafeno en los tejidos seminales de la semilla de *C. pepo* también indujo a una sobreexpresión de la enolasa, cuya actividad, se ha reportado que se relaciona directamente con el desarrollo secundario de tallos y raíces, así como en éstas últimas, con una mayor densidad de pelos radicales (Eremina *et al.*, 2015); favoreciendo al sistema completo para una mayor absorción de agua y nutrientes (Eremina *et al.*, 2015).

En cuanto a la sobreexpresión de las diferentes isoformas de la malato deshidrogenasa (MDH - extramitocondriales), incluyendo la ubicada en el citosol, éstas son activadas cuando las plantas se encuentran bajo alguna condición de estrés abiótico como el que representa la aplicación de grafeno (Qing *et al.*, 2016); Qing *et al.* (2016) encontraron que una sobreexpresión del gen que codifica para esta enzima (citosol), incrementa la tolerancia ante el estrés oxidativo provocado por las condiciones imperantes, debido al incremento proporcional en la disponibilidad del poder reductor por acción de esta isoforma (Qing *et al.*, 2016).

Estas enzimas se han visto sobrerreguladas ante factores de estrés abiótico como bajas temperaturas y salinidad, por lo que podemos suponer que el grafeno está activando señales similares.

6.1.1.5 Síntesis/ preservación y degradación de proteínas

Las proteínas relacionadas con el estrés, incluidas las proteínas de choque térmico y las chaperonas juegan un papel crucial en protegiendo las plantas contra el estrés, facilitando el plegamiento de proteínas y manteniendo la homeostasis celular (Wang *et al.*, 2011). En el presente estudio, el aumento de estas proteínas en las raíces expuestas al grafeno, pueden estar asociadas con mecanismos de defensa, como han demostrado resultados anteriores, que las proteínas de choque térmico protegen contra el estrés oxidativo inducido por NPs metálicas en maíz (Yasmeen *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2012).

Las chaperoninas están implicadas en la importación de proteínas en las mitocondrias y el ensamblaje macromolecular para facilitar el plegamiento correcto de las proteínas importadas y también prevenir el plegado incorrecto, además de promover el re-plegamiento y el ensamblaje adecuado de los polipéptidos desplegados generados en condiciones de estrés en la mitocondria. Bajo condiciones de estrés se pueden inhibir y estimular diferentes vías de importación de proteínas en las mitocondrias de las plantas. El proceso de importación es fundamental para la biogénesis mitocondrial tanto para reparar órganos celulares dañados como para aumentar el volumen mitocondrial. El aumento de la acumulación de grupos de proteínas, que participan en la biogénesis de las mitocondrias durante el estrés revela su importancia en los mecanismos de protección celular (Mishra *et al.*, 2018).

6.1.2 Bioensayo de siembra en sustrato: Parámetros morfo-fisiológicos

Al hacer la proyección sobre las respuestas de las plantas de calabacita Zucchini ante esta dosis de grafeno “alta” (1000 mg L⁻¹) en las principales variables morfo-fisiológicas de interés agronómico (altura de planta, diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, longitud de raíz, contenido de biomasa e IRC (Índice Relativo de Clorofila), dentro de un periodo más prolongado (25 días) y un medio de crecimiento diferente (sustrato); se pudo percibir que el estímulo generado por la aplicación de grafeno, tuvo un efecto positivo en las plantas, mostrando incrementos generales significativos ($p < 0.05$; T-student;) en casi la totalidad de las variables propuestas, con excepción del tamaño de la lámina foliar (área foliar; N.S.), donde las plantas de ambos tratamientos (control y 1000 mg L⁻¹ grafeno) desarrollaron en promedio las similares dimensiones foliares, sin embargo, se pudo percibir una tendencia a también ser mayores en las plantas tratadas con grafeno.

Cuadro 4. Respuesta morfológica observada en plantas de *Cucurbita pepo* tratadas con grafeno (Veinticinco días después de la emergencia de la plántula).

Variable morfo-fisiológica	Control (0 mg L ⁻¹)	Grafeno (1000 mg L ⁻¹)
Altura Tallo (cm)	14.52 ± 0.24 b	15.69 ± 0.42 a
Diámetro de Tallo (mm)	2.75 ± 0.08 b	3.0 ± 0.09 a
Número de Hojas**	3.81 ± 0.16 b	4.65 ± 0.12 a
Área Foliar (cm ²)	25.70 ± 3.49 a	30.33 ± 2.54 a
IRC**	21.71 ± 0.75 b	24.14 ± 0.28 a
Biomasa del vástago(mg)**	2.11 ± 140.8 b	2.60 ± 120.1 a
Longitud de raíz (cm)	11.88 ± 0.37 b	14.7 ± 1.12 a
Biomasa de la raíz (mg)	368.0 ± 30.89 b	437.81 ± 21.85 a

Valores de medias y E.E con literales diferentes en la misma hilera denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos. **: $p < 0.01$. Se consideraron 5 repeticiones; N= 30.

El grafeno y sus derivados son considerados contaminantes ambientales emergentes y su toxicidad para las plantas requiere una investigación cuidadosa debido a que el efecto de este material puede variar dependiendo de la matriz en el cual sea aplicado. Diversas investigaciones han encontrado que el transporte de grafeno en sistemas hidropónicos es completamente diferente al del suelo o sustrato, lo que podría afectar la interacción entre el grafeno y las plantas. Mientras que en cultivos hidropónicos puede mostrar toxicidad, en cultivos con sustrato es capaz de incrementar la biomasa, la longitud de las plántulas y la capacidad fotosintética (Chen *et al.*, 2018). Por lo anterior es muy importante estudiar el impacto del comportamiento bioquímico y fisiológico de los nanomateriales en diferentes etapas, medios de crecimiento y forma de aplicación para reflejar el efecto biológico real y potencial de este NM.

6.1.3 Pruebas bioquímicas sobre el estado de estrés oxidativo.

Para contar con la tendencia dinámica de las variables bioquímicas contempladas para el tejido radical en una etapa fenológica más avanzada (25 días después de la emergencia de la plántula), se llevó a cabo la evaluación de las variables relacionadas con el estallamiento oxidativo generado por el grafeno, vinculadas a la producción de ERO (cuantificación de H₂O₂ intracelular) y su compensación antioxidante,

para comprobar si los cambios observados a nivel morfo-fisiológico, se encontraban inducidos por un estado de estrés generado por la aplicación de este NM, como se observó previamente en los ensayos de germinación.

La toma de muestras para estos ensayos se realizó al día 25 dde (después de emergencia de la plántula), tomado este día como el tiempo cero (0 h), en el caso del H₂O₂ por su naturaleza se cuantificó su contenido a las 12 h posteriores a la aplicación de la solución de grafeno (1000 mg L⁻¹). En el Cuadro 5 se muestra el contenido de H₂O₂ en el tejido presentando una mayor concentración en el tratamiento (0.192 ± 0.011 μmol) equivalente a un 81 % más (p < 0.01), en comparación con el tejido control (0.106 ± 0.007 μmol). Dando seguimiento al contenido de esta ERO al cabo de 8 h, se pudo registrar una disminución altamente significativa (p < 0.01), equivalente a un 52 % con respecto a la concentración registrada al inicio del experimento; mientras que el control se mantuvo en un intervalo estadísticamente similar (no significativo-N.S.; Cuadro 5).

Al respecto, Rico *et al.* (2015) han referido la condición de estrés abiótico que representan los NMs derivados del carbono para las plantas, al dar origen a un estallamiento oxidativo mediante el incremento de las concentraciones de O₂⁻ y su conversión a H₂O₂ por acción enzimática (SOD). A pesar de que la mayor producción H₂O₂ tiene lugar en los peroxisomas y se deriva de la actividad de SOD; no es la única forma en la que se produce esta ERO (Corpas, 2015); también puede ser a partir de la actividad de enzimas oxidantes (Corpas *et al.*, 2017); e.g. Acil CoA oxidadas (catabolismo de ácidos grasos), glicolato oxidasa (fotorrespiración); a la vez dependerá de la disponibilidad de electrones en las reacciones en las que el oxígeno funge como último receptor de éstos, en caso de haber suficientes (4 electrones-reducción tetravalente), la formación a la que puede dar lugar, es de agua; en caso de que no existan electrones suficientes dicha reducción no será completada y el oxígeno alcanzará estados intermedios del proceso (O₂⁻, H₂O₂, etc.) (Leung, 2018).

Cuadro 5. Concentración de peróxido de hidrógeno intracelular radicular de plantas de *Cucurbita pepo* (μmol de H₂O₂).

	Control	Grafeno (1000 mg L⁻¹)
0 h	0.106 ± 0.007 b	0.192 ± 0.011 a
8 h	0.091 ± 0.005 b	0.148 ± 0.006 a

Valores de medias y E.E con literales diferentes en la misma hilera denotan una diferencia estadística altamente significativa (p < 0.01) entre tratamientos. Se consideraron 5 repeticiones; N = 10.

Un incremento súbito en la concentración de H_2O_2 intracelular, pero rápidamente contrarrestado, puede fungir como mecanismo de señalización para la activación de diversas rutas metabólicas antioxidantes mejorando así la tolerancia del sistema de manera integral, tal como ocurrió al introducir NTC en plantas de trigo (Rico *et al.*, 2015); siendo similar el patrón mostrado por parte de las raíces de *C. pepo* correspondientes al tratamiento con grafeno (1000 mg L^{-1}), al observarse un decremento en la concentración de H_2O_2 , al cabo de 12 h de haber realizado la aplicación de la suspensión; lo que sugiere que el estímulo que representa el ingreso del grafeno a la célula, no llega a significar que el estrés oxidativo generado alcance sus etapas críticas, deletéreas y de muerte celular. El hecho de que, en las células del tejido, haya disminuido la concentración de H_2O_2 , significa que tuvo lugar una respuesta metabólica antioxidante que evitó dichos escenarios, y haciendo un enfoque dirigido hacia el lado enzimático; a continuación, se describirá la actividad registrada por aquellas que utilizan este compuesto (H_2O_2) como sustrato y realizan la misma función antioxidante (POX, APX y CAT).

Pasando a la actividad de SOD en la raíz de *C. pepo* que la aplicación de grafeno al momento de generarse el estímulo no significó un incremento importante en la concentración de superóxido ya que la actividad registrada por parte de esta enzima que lo ocupa como sustrato, fue estadísticamente similar a la encontrada en los tejidos control ($19 \text{ UI/ mg de proteína}$, aprox.). Y al cabo de 8 h, la actividad de dismutación disminuyó de forma altamente significativa ($p < 0.01$; T student), mientras que en el tratamiento control, la actividad de SOD no tuvo diferencia estadística alguna al cabo de 8 h (Cuadro 6). Cabe señalar que la inhibición en la actividad de esta enzima puede tener lugar ante un incremento prolongado en la concentración de H_2O_2 (Bhoomika *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2016) una inhibición en la actividad SOD al exponer plantas de trigo a concentraciones mayores a 1000 mg L^{-1} , probablemente debida a la oxidación de los aminoácidos residuales que impiden un enlace adecuado en el sitio activo (Zhang *et al.*, 2016; Jordan *et al.*, 2018). Por otro lado, con relación a lo reportado con otros NMs, como los NTCM; en plántulas de *C. pepo* se ha observado que éstos tienen cierta capacidad para intervenir en reacciones redox de forma similar en la que lo hace la SOD, pudiendo llegar a conformar un mecanismo de desintoxicación más eficiente (Hatami, 2017).

Ante la formación súbita de H_2O_2 intracelular en las raíces de calabacita tratadas con grafeno la maquinaria celular se vale de mecanismos antioxidantes de naturaleza enzimática para conservar un estado de equilibrio; dónde está ERO fungirá como sustrato para formar agua (actividad POX, APX y CAT; Gupta *et al.*, 2018). En el Cuadro 6 se presentan los resultados del seguimiento de enzimas antioxidantes 12 h posteriores a la aplicación de grafeno. En donde se puede observar un comportamiento de activación de estas enzimas, teniendo como una respuesta rápida, el incremento de la actividad POX equivalente a 0.46

veces (4.48 ± 0.28 U/ mg de proteína; 0 h) más, en comparación de las raíces control (3.07 ± 0.19 U/ mg de proteína; 0 h; $p < 0.01$); reduciéndose significativamente su actividad al cabo de 12 h ($p < 0.05$). El grafeno indujo a una mayor actividad de POX y se encontró un patrón similar al expuesto por Tsukagoshi (2016) donde una mayor actividad de peroxidasa se relacionó con un mayor tamaño en los órganos que presentaban esta condición, en comparación con aquellos con menor actividad. Es importante destacar que el decremento en la tasa de peróxido de hidrógeno es atribuible en parte a su reducción por la catálisis realizada por POX, o también por la transferencia de electrones entre estos NMs hacia el peróxido de hidrógeno, o bien por la actividad de otras enzimas (Park *et al.*, 2016).

En el caso de la APX y CAT, ambas incrementaron su actividad 0.39 y 0.62 veces respectivamente (2.88 ± 0.22 U/ mg de proteína y 0.267 ± 0.055 U/ mg de proteína, respectivamente), en comparación con la actividad de sus respectivos controles (1.46 ± 0.06 y 0.166 ± 0.033 U/ mg de proteína); sin embargo, su incremento no se sostuvo al cabo de 12 h (1.72 ± 0.05 U/ mg de proteína y 0.18 ± 0.03 U/ mg de proteína, respectivamente). Resultando esta diferencia significativa para el caso de APX ($p < 0.01$; Cuadro 6). La reducción en la actividad enzimática pudo derivarse de que, al transcurrir este periodo de tiempo, la cantidad de H_2O_2 que funge como sustrato de estas enzimas ya no estaba disponible en el medio, o bien, que la conformación funcional de la enzima resultara afectada derivando en una inhibición alostérica (Ahmad y Prasad, 2012)

Un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes puede derivar en una adaptación por parte del organismo en general (en este caso *C. pepo*) a condiciones de estrés por factores abióticos (Leung, 2018).

Cuadro 6. Actividad específica de Peroxidasas, Ascorbato peroxidasas y Catalasas en raíces de *C. pepo* bajo tratamiento con grafeno.

	SOD (UI/mg de proteína)		POX (UI/mg de proteína)		APX (UI/mg de proteína) **		CAT (UI/mg de proteína) ^{N.S.}	
	Control	Grafeno	Control	Grafeno	Control	Grafeno	Control	Grafeno
0h	19.04 ± 0.1 a	19.28 ± 0.11 a	3.07 ± 0.19 b	4.48 ± 0.28 a	1.46 ± 0.06 b	2.88 ± 0.22 a	0.17 ± 0.03 b	0.27 ± 0.06 a
12h	19.6 ± 0.16 a	14.58 ± 0.21 b	2.96 ± 0.17 a	3.65 ± 0.36 a	1.30 ± 0.03 b	1.72 ± 0.05 a	0.13 ± 0.02 a	0.18 ± 0.03 a

Valores de medias y E.E con literales diferentes en la misma columna denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). **: ($p < 0.01$). N.S.: No es significativo. Se consideraron 5 repeticiones por tratamiento; N = 10; excepto en la prueba para SOD (por disponibilidad del kit utilizado se consideraron 4 repeticiones), donde N=8.

La actividad de APX y POX está vinculada a un estado redox particular en los diversos compartimientos celulares. Su diferencia radica en que, como agente reductor, la APX utiliza ácido ascórbico (no compuestos fenólicos; Zargar *et al.*, 2018). Una condición limitante sobre la intervención de esta enzima es la disponibilidad de ácido ascórbico, su concentración (en las plantas) puede encontrarse dentro de un rango de 1-20 mM, considerándose apta (Demidchik, 2015). Posee gran afinidad por su sustrato (Zargar *et al.*, 2018). Su función está directamente ligada a otros procesos antioxidantes importante, el ciclo ascorbato-glutación (ASC-GSH) (Courtney *et al.*, 2016), mismo que garantiza su perpetuidad funcional (Demidchik, 2015). Zargar *et al.* (2018) registraron la importancia en proporción de la actividad de la APX al determinar la cantidad de DHA (dehidroascorbato) en plantas sometidas a cierto tipo de estrés (e.g. salinidad); ya que, bajo condiciones de normales, la cantidad de DHA (dehidroascorbato) con relación al ácido ascórbico, es baja; en cambio en la plantas bajo estrés, dicha cantidad aumenta; recordando que el DHA se forma como producto junto con el agua, en la reacción catalizada por APX (Zargar *et al.*, 2018). En cuanto al embate oxidativo, una sobreexpresión de los genes que codifican para APX, le brindan una ventaja adaptativa a la planta ante el estallamiento oxidativo derivado de factores bióticos o abióticos (Singh *et al.*, 2010).

En cambio, la CAT (exclusiva de los peroxisomas; Corpas, 2015), no requiere de un agente reductor para llevar a cabo su función (Bhoomika *et al.*, 2013), por lo que no depende de una condición redox en particular. Sin embargo, disminuciones significativas en su actividad, se han reportado en plantas en etapa de maduración de fruto o senescencia; o bien, cuando se encuentran bajo tipo de estrés (Corpas, 2015). Zhao *et al.* (2015) reportaron que, al probar concentraciones bajas de otro NM derivado del carbono, OG (10-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) en plantas de *Arabidopsis*, no hubo una diferencia significativa en la actividad de CAT (Zhao *et al.*, 2015). En otra investigación, al probar la interacción del óxido de grafeno con algas *Chlorella vulgaris*, se encontró que la actividad de CAT se inhibió en comparación con las algas control de forma dependiente y en relación directa con la concentración (0.01 - 10 mg L^{-1}), esto probablemente debido a la inhibición selectiva de la actividad enzimática provocada por el óxido de grafeno, derivado de los efectos oxidativos potenciales de la reacción entre los grupos funcionales del OG y los aminoácidos terminales de CAT (Hu *et al.*, 2014).

Por parte de la respuesta celular antioxidante de naturaleza no enzimática, se consideró a este particular aminoácido (prolina), como un indicador complementario del grado del estrés oxidativo celular inducido por la aplicación de grafeno. Tomando en cuenta la dinámica referida en cuanto al muestreo diferencial en tiempo tras la aplicación de grafeno (0 y 12 h), fue posible observar un incremento significativo en la concentración de prolina ($p < 0.05$; t - student) después de 12 h de haber realizado la

aplicación, siendo un incremento equivalente a un 55 %, con respecto a la concentración previa (0 h; Cuadro 7), pasando de 771.97 ± 16.27 a $1,197 \pm 108.73$ $\mu\text{mol/g}$ de raíz (12 h). Mientras que en las raíces de las plantas control la concentración de prolina, se mantuvo en un rango similar estadísticamente, de aproximadamente 800 μmol de prolina (ANOVA; $p = 0.70$; Cuadro 7).

Cuadro 7. Contenido de prolina en raíces de *Cucurbita pepo* tras la aplicación de grafeno ($\mu\text{mol/g}$ de tejido).

	Control	Grafeno (1000 mg L ⁻¹)
0 h	792.39 ± 25.41 a	771.97 ± 16.27 a
12 h	811.14 ± 16.88 b	$1,197.11 \pm 108.73$ a

Valores de medias y E.E con literales diferentes en la misma hilera denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.01$). Se consideraron 5 repeticiones; $N = 10$.

La prolina es un aminoácido que debido a su composición aromática (no polar) le brinda rigidez estructural a las proteínas en las que se integra, además, funciona como un metabolito osmo-protector (Lodeyro *et al.*, 2015). La principal forma en la que se produce este particular aminoácido en el citoplasma es utilizando poder reductor (NADPH) y glutamato como precursor; en caso de que el glutamato se transaminara, seguiría la ruta en sentido opuesto a la síntesis de prolina, dando lugar a la formación de α cetoglutarato (intermediario en el ciclo de Krebs; (Huyi *et al.*, 2018). Una ruta alternativa y menos común, es a partir de la ornitina, en la cual es posible mantener una fuente disponible de nitrógeno en casos de alguna limitación surgida de un episodio de estrés (Kaur *et al.*, 2015). A nivel de genes, existen dos que regulan la biosíntesis y acumulación de prolina, los P5CS 1 y 2, éstos codifican para la pirrolina 5 carboxilasa sintetasa, por lo general, se encuentran activos en los meristemos apicales; sin embargo, en el resto de la planta, pueden activarse por la presencia de H_2O_2 , oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y ABA (Huyi *et al.*, 2018; Fernández *et al.*, 2012). Una de las formas en las que la prolina se vincula con el estado energético de la célula bajo condiciones de estrés, es donde su sobreproducción sirve para mantener cierto nivel de NADP^+ que evita la generación en exceso de ERO (Kaur *et al.*, 2015). Esto debido a que la síntesis de prolina al requerir de NADPH, genera NADP^+ disponible; y una razón baja de $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, ayudará a mantener el flujo de electrones, evitando un desbalance redox abrupto. Por lo anterior, la prolina se considera un metabolito clave que puede activar e involucrarse en vías alternativas antioxidantes en beneficio de la homeostasis celular (Lodeyro *et al.*, 2015).

La acumulación de prolina está relacionada con casos de estrés hídrico o salino, donde ésta, se da como estrategia para reducir el potencial hídrico dentro de la célula, sin afectar su pH (Agrawal *et al.*, 2015). También bajo condiciones de exposición a metales pesados, radiación UV, bajas temperaturas y alta luminosidad (Al-Khayri *et al.*, 2016); se ha registrado una importante acumulación de este aminoácido, que evita daños en membranas y enzimas; estabilizando la estructura cuaternaria de las proteínas y evitando la acumulación de ERO (Lodeyro *et al.*, 2015).

En este sentido, también hay reportes donde se destaca la función antioxidante de la prolina, debido a su capacidad de neutralizar la reactividad del $^1\text{O}_2$, OH^\cdot , O_2^\cdot y H_2O_2 y de estabilizar/activar enzimas con función antioxidante, como en los casos de la actividad de CAT, SOD, POX y APX, que dependen en gran medida de la concentración de prolina (Szabados *et al.*, 2009).

En cuanto a las respuestas reportadas sobre la acumulación de prolina al suministrar NMs similares Anjum *et al.* (2014) reportaron igualmente una mayor acumulación de prolina al aplicar OG (*Vicia faba*), sin embargo, al llegar a una dosis de 1600 mg L^{-1} , el contenido de este aminoácido disminuyó drásticamente, incrementando la generación de ERO, dada la correlación inversa entre el contenido de prolina y la generación de ERO (Anjum *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2016). Donde el contenido de prolina se relacionó de forma positiva con la actividad de CAT y APX; y de forma negativa con los carbonilos disponibles, indicando la estabilidad de los enlaces peptídicos, principalmente entre los grupos tiol (Anjum *et al.*, 2014; Hinoux *et al.*, 2016). La prolina debido a su función antioxidante y contribución a la estabilización tanto de membranas como de proteínas en aquellas plantas donde se encontró acumulada de manera significativa se redujo la oxidación de proteínas y lípidos mostrando efectos positivos a nivel fenotípico y fisiológico, como mayor vigor y acumulación de biomasa (Anjum *et al.*, 2014).

Pasando a otra variable analizada; la importancia de llevar a cabo la determinación del contenido de clorofila radica en el vínculo que mantiene la clorofila con el inicio del proceso de acumulación de biomasa (fotosíntesis). La clorofila es un pigmento presente en la membrana de los tilacoides, que permite la captación de fotones cuya equivalencia energética está comprendida en un rango de longitudes de onda dentro del espectro visible, correspondiente a la región azul (400 - 470 nm) y roja (600 - 700 nm), que resultan fundamentales para el proceso de fotosíntesis (Hörtensteiner *et al.*, 2010). Recientemente se han incluido evaluaciones del contenido de clorofila de las plantas expuestas a NMs como parámetro indicador de fitotoxicidad (Mosa *et al.*, 2018); debido a que cuando los NMs son adsorbidos a la superficie radicular, interrumpe la absorción de macro y micronutrientes requeridos para el desarrollo de la planta y con ello el contenido de clorofila. Martínez-Fernández *et al.* (2016) investigaron la captación de agua contaminada con NPs de óxido de hierro por las raíces de *Helianthus annuus*, ellos encontraron que los macronutrientes como

Ca, K, Mg y S se redujeron en los brotes de la planta, y en consecuencia los contenidos de clorofila también disminuyeron. En los resultados obtenidos en esta investigación, se pudo observar que al momento inicial del experimento (tiempo 0), el contenido de clorofila en las hojas de *C. pepo* del tratamiento control, era al menos 0.6 veces mayor en su tipo *b* y total (2.91 ± 0.16 y 9.64 ± 0.18 mg L⁻¹, respectivamente), en comparación con las plantas emergidas a partir de semillas tratadas con grafeno (1.82 ± 0.06 , 5.8 ± 0.23 mg L⁻¹, respectivamente; $p < 0.01$) y del doble en el tipo de clorofila *a* (40.0 ± 0.73 mg L⁻¹ vs. 20.0 ± 1.1 mg L⁻¹; $p < 0.05$; Cuadro 8). Al cabo de 12 h de haber hecho la segunda aplicación de grafeno se pudieron registrar incrementos de al menos 1.4 veces, que fue el caso de la clorofila *b* (4.46 ± 0.26 mg L⁻¹) y como máximo, de 2.5 veces para la clorofila *a* (38.5 ± 1.2 mg L⁻¹; $p < 0.05$), con respecto a la concentración que presentaron al tiempo inicial; resultando también en un incremento significativo en comparación con el contenido de las plantas control ($p < 0.01$) Cuadro 8.

Dependiendo de la concentración de este pigmento y de la eficiencia con la que se haga la conversión energética fotón-electrón, se favorecerá la fijación de CO₂ y no la sobreproducción de ERO en los cloroplastos (Hu *et al.*, 2016). Destacando que la probabilidad para que ocurra el primer escenario (fijación de CO₂) y se descarte el segundo (sobreproducción de ERO), tiene lugar cuando se incrementa la concentración de clorofila en los tilacoides (Zhang *et al.*, 2016). La concentración de clorofila en el tejido fotosintético puede variar, dependiendo del grado de estrés biótico o abiótico impuesto por el ambiente, del estado nutricional de la planta, y la etapa fenológica en la que se encuentre la especie. Por lo que cabe mencionar que, en la presente investigación, el estrés inducido en las plantas de *C. pepo* se generó a partir de la aplicación de la suspensión de grafeno (1000 mg L⁻¹); y que la nutrición de las plantas se satisfizo mediante la aplicación de una solución preparada a partir de los requerimientos ideales para la especie (FertiDrip® 20-20-20 + microelementos); y la etapa fenológica en la que se realizó la toma de datos fue la vegetativa, por lo que ninguna de las 2 condiciones representaron un factor que comprometiera la presencia y función de este pigmento.

El grafeno es un material que dentro de un sistema fotoelectrónico como el de los complejos receptores de luz (LHC, por sus siglas en inglés) puede tener diferentes impactos potenciales, como: disminuir la fluorescencia y transformar los fotones a electrones (Fontes *et al.*, 2014); y en este sentido como se ha comentado, repercutir en el metabolismo de la planta de manera importante. Al respecto, Hu *et al.* (2014) encontraron un incremento en la síntesis de clorofila en las hojas de arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*), expuestas a grafeno (200 mg L⁻¹) en combinación con ácido húmico; este incremento se correlacionó de manera inversa ($r = 0.9$) con metabolitos como el ácido glucónico (indicador de la oxidación de la glucosa) y aconítico (intermediario en la isomerización del citrato en la oxidación de acetil

coenzima-A, del ciclo de Krebs); y de manera directa con la manosa ($r > 0.9$) en las hojas de ambas especies (hexosa intermediaria en la glucólisis). Por su parte, Zhang *et al.* (2016) encontraron una disminución en el contenido relativo de clorofila (IRC), equivalente al 15 %, después de haber expuesto plántulas de *T. aestivum* a una concentración constante de grafeno (500 mg L^{-1}) durante 30 días, en comparación con las hojas control; también fue posible notar la baja eficiencia en el proceso fotosintético aunada a la inhibición de la síntesis de clorofila por la poca disposición de Mg^{+2} , a través de la estimación de la energía que se destinaba para la fluorescencia, ya que los registros tendían al máximo rendimiento cuántico para este fenómeno, por lo que la medición de ambas variables permitió deducir la afectación en el fotosistema PSII de las hojas tratadas con grafeno. La repercusión de lo ocurrido pudo apreciarse desde un enfoque más general, donde fue evidente el viraje metabólico inducido por el NM, hacia la vía respiratoria (Hu *et al.*, 2014).

Sin embargo, es importante señalar que los contrastes en las respuestas por parte de las plantas a los NMs derivados del carbono dependerán en gran medida del tamaño de las láminas de grafeno (Chen *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2019), su método de obtención, la concentración de las suspensiones suministradas y el tiempo de exposición (Zhang *et al.*, 2016); siendo notable que en ningún experimento en cuyo tiempo de exposición al grafeno fuera mayor a 4 días, se encontró un efecto positivo en el contenido de clorofila (Skoda *et al.*, 2014), resultando en bajas concentraciones de nutrientes como N, K y Mg (Zhang *et al.*, 2016).

Cuadro 8. Contenido de clorofila en las plantas de *Cucurbita pepo* bajo tratamiento con grafeno.

	Clorofila a ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)		Clorofila b ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)		Clorofila total ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	Control	Grafeno (1000 mg L^{-1})	Control	Grafeno (1000 mg L^{-1})	Control	Grafeno (1000 mg L^{-1})
0 h	$0.04 \pm .001$ a	0.02 ± 0.001 b	2.91 ± 0.16 a	1.82 ± 0.06 b	9.64 ± 0.18 a	5.8 ± 0.23 b
12 h	$0.04 \pm .002$ b	0.07 ± 0.002 a	2.65 ± 0.10 b	4.46 ± 0.26 a	8.85 ± 0.37 b	15.93 ± 0.59 a

Valores de medias y E.E con literales diferentes en la misma hilera denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.01$). Se consideraron 5 repeticiones; N =10.

6.2 Respuestas fisiológicas y bioquímicas de *Cucurbita pepo* asociadas al efecto de nanopartículas de óxido de cobre.

El uso de NPs CuO puede sustituir el uso de compuestos tradicionales (fertilizantes) empleados como fuente de Cu para las plantas de interés agrícola, teniendo un efecto más focalizado y, por lo tanto, eficiente (Siddiqui *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante determinar la cantidad de NPs requerida, dependiendo de la sensibilidad de cada especie de interés, en este caso de *Cucurbita pepo*, variedad Zucchini; para lo cual también resulta necesario establecer un rango de seguridad de aplicación para evitar condiciones de fitotoxicidad.

6.2.1 Ensayos de germinación estándar - ISTA

Tras realizar evaluar la calidad fisiológica de las semillas (*C. pepo*) a los 14 días de su imbibición en suspensiones de NPs CuO (0.25 mg L⁻¹ a 1000 mg L⁻¹), permitieron determinar, tanto la concentración óptima para la especie (25 mg L⁻¹); que fue aquella que mostró tener el mayor efecto significativo sobre el vigor de las semillas (10 % mayor en comparación con el control; ANOVA, $p < 0.05$); como la concentración mínima fitotóxica (250 mg L⁻¹), a partir de la cual, fue apreciable una alteración en la morfología, principalmente de la raíz (Figura 13), repercutiendo sobre el número de plántulas consideradas como “normales” y por ende, en su vigor, siendo 50.9 % menor en comparación con las plántulas control ($p < 0.05$; Cuadro 9). Las dosis mayores a 250 mg L⁻¹ dieron lugar a malformaciones o aberraciones en los órganos de todas las plántulas evaluadas, impidiendo su consideración para dentro de la categoría “normal”, por lo que se estimaron como plántulas no vigorosas y se continuó el análisis con las dosis que incluían al menos una plántula “normal” dentro de las repeticiones consideradas, delimitando el bioensayo a la aplicación de 0 – 250 mg L⁻¹ NPs CuO.

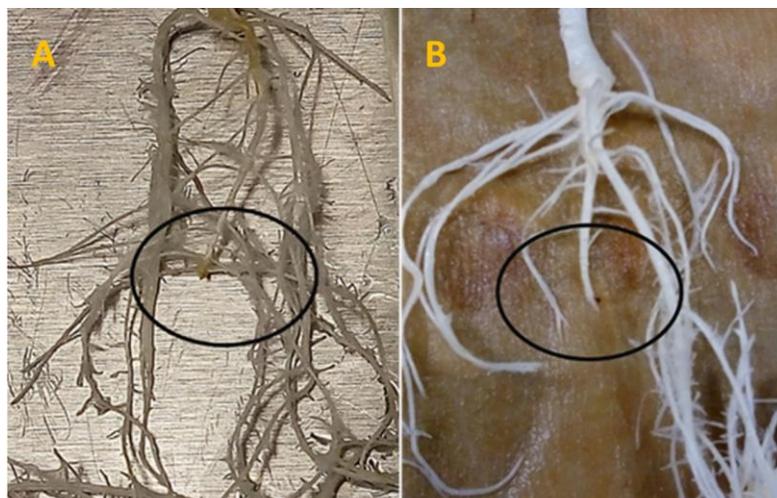


Figura 14. Raíces de plántulas de *Cucurbita pepo* bajo tratamiento con soluciones de nanopartículas de óxido de cobre.

a) Raíces sin tratamiento; b) tratamiento 1000 mg L⁻¹ de NPs CuO).

En cuanto al efecto inducido por las NPs CuO sobre el resto de las variables, éstas repercutieron de manera significativa ($p < 0.05$) sobre la tasa de germinación, donde, pudieron observarse en los tratamientos de concentraciones bajas (0.5, 10 y 25 mg L⁻¹), incrementos de hasta 6 unidades (%) con respecto a las semillas control (88.0 ± 4.53 %), con tasas de germinación de 90.0 ± 6.32 %, 91.2 ± 3.24 %, y 94.0 ± 3.16 %; respectivamente. Sin embargo, al exponer las semillas a las concentraciones ≥ 50 mg L⁻¹, la tasa de germinación se redujo en promedio un 6 % con respecto al control. Sobre la LR y LP se registraron reducciones a partir de la concentración de 50 mg L⁻¹ hacia las mayores, mismas que tendieron a acumular altas cantidad de biomasa en ambos tejidos con respecto al control (N.S.), esto probablemente debido a la lignificación parcial inducida por las NPs (Da Costa *et al.*, 2016); sin embargo, con la concentración de 25 mg L⁻¹ se obtuvo la mayor acumulación de biomasa ($1,419.2 \pm 83.98$ mg), equivalente a un 10.5 % más (N.S.) con respecto a las plántulas control ($1,284.3 \pm 86.31$ mg) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Respuestas morfológicas de plántulas de *Cucurbita pepo* tratadas con nanopartículas de óxido de cobre.

NPs CuO (mg L ⁻¹)	Germinación (%)	LR (mm)	LP (mm)	Biomasa de plántula (mg)	Vigor (%)
0	88.0 ± 4.53 ab	195.2 ± 16.2a	124.4 ± 9.3c	1,284.3 ± 86.31a	75.0 ± 4.7b
0.25	82.4 ± 3.87 b	178.0 ± 17.5 b	133.1 ± 9.4b	1,278.7 ± 127.9a	61.6 ± 5.2b
0.5	90.0 ± 6.32a	196.2 ± 11.1a	148.3 ± 11.6a	1,116.0 ± 153.41a	74.0 ± 2.3 b
10	91.2 ± 3.24 a	179.2 ± 16.2ab	139.2 ± 9.5ab	1,124.9 ± 87.26a	73.6 ± 2.1b
25	94.0 ± 3.16a	189.3 ± 16.6ab	142.0 ± 9.2a	1,419.2 ± 83.9 a	82.5 ± 1.8a
50	81.0 ± 3.53b	148.1 ± 17.4c	124.1 ± 9.6 c	1,397.3 ± 103.1a	71.0 ± 4.8 b
100	80.8 ± 3.6 b	152.6 ± 19.2 bc	124.5 ± 10.2c	1,381.5 ± 116.72a	55.0 ± 6.0 bc
250	86.4 ± 3.6ab	169.3 ± 23.6abc	137.6 ± 11.7ab	1,389.5 ± 85.34a	42.0 ± 5.2 c

Valores de medias y E.E con literales diferentes en la misma columna denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Análisis a los 8 días. Se consideraron 5 repeticiones; N = 400.

Al evaluar el efecto de este tipo de NPs (CuO; 0.8 - 800 mg L⁻¹) en otras especies (lechuga), pudo observarse una tendencia similar en su tasa de germinación dentro de un rango específico de concentración, donde, los mayores porcentajes, se obtuvieron en el rango de 0.8- 50 mg L⁻¹ (Margenot *et al.*, 2018), en el cual, la cantidad de Cu²⁺ generada a partir de la disolución de las NPs CuO, no significó impacto alguno sobre la variable estimada; no así, en concentraciones más altas, en las que se logró apreciar una relación directa entre la concentración de NPs CuO y la generación de Cu²⁺, que dio lugar a reducciones significativas en la tasa de germinación (Dimkpa *et al.*, 2012).

Los cambios observados en la morfología de la raíz derivados de la interacción con las NPs CuO, dependieron principalmente, de la concentración e internalización de estas, así como, de la generación de los iones (Cu²⁺) a partir de éstas. Donde las primeras (concentración/internalización) se vinculan al tamaño de las NPs, ya que en caso de tener dimensiones por encima de los 50 nm, se complicaría su ingreso a la célula por la barrera física que representa la pared celular, quedando así, acumuladas en el apoplasto, provocando varias complicaciones funcionales, incluyendo el ingreso de agua (Margenot *et al.*, 2018), ante

lo cual, la planta como estrategia de adaptación, se esperaría que tendiera a activar mecanismos para la elongación de su raíz, además de promover el desarrollo de raíces secundarias (Ke *et al.*, 2017).

Aunque la solubilización de iones (Cu^{2+}) se da en menor proporción cuando el cobre se encuentra en forma de NPs que cuando forma una sal (teniendo en este último caso un mayor efecto fitotóxico; Ke *et al.*, 2017), no es despreciable su daño potencial, ya que ha sido posible establecer en algunos casos, una relación inversa entre la concentración de NPs ($> 40 \text{ mg L}^{-1}$) y la elongación de la raíz y vástago (Margenot *et al.*, 2018); o, como en el caso de las raíces de *Oryza sativa* (1000 mg L^{-1}), donde fue posible observar una acumulación en el tejido de 76 veces más en comparación con las plantas control, lo que llevó a un estrés osmótico que derivó en una reducción considerable de biomasa (Da Costa *et al.*, 2016); distinguiendo que cualquier alteración en los 3 casos (reducción raíz/ tallo y biomasa), signos indicadores de estrés, de no ser contrarrestados, provocarían otras alteraciones más drásticas como las encontradas en las concentraciones $> 250 \text{ mg L}^{-1}$ en la presente investigación, muestra de la condición de fitotoxicidad prevalente, comprometiendo en gran medida, la eficiencia de las funciones de estos órganos (Siddiqui *et al.*, 2015).

En cuanto a la producción de biomasa en las plantas tratadas con NPs CuO, se han reportado resultados con relación a las 2 posibles condiciones inherentes al respecto (mayor y menor acumulación), considerando que las dosis óptimas y el umbral de tolerancia van a cambiar dependiendo de la especie utilizada como modelo de estudio. Al probarse concentraciones dentro del umbral y con cercanía a las dosis óptimas, se pueden percibir incrementos significativos, como el caso de *Phaseolus vulgaris* con concentraciones $< 50 \text{ mg L}^{-1}$ (Lira *et al.*, 2018). En cambio, cuando las concentraciones están fuera del umbral mencionado, se ha reportado e.g., en plantas de la misma especie (*Cucurbita pepo* var. Zucchini), *O. sativa*, *Phaseolus radiatus* y *T. aestivum*; que la exposición a concentraciones $\geq 1000 \text{ mg L}^{-1}$, provoca reducciones equivalentes entre 16 y 90 % en el contenido de biomasa en comparación con las plantas control (Da Costa *et al.*, 2016). Sin embargo, dentro de lo anterior, hay que considerar otro factor importante, el tiempo de exposición, donde una interacción continua y prolongada (mayor a 3 días) puede afectar el rendimiento de la biomasa de las plantas expuestas, inclusive a concentraciones bajas 10 y 50 mg L^{-1} , en proporciones similares a las anteriores (47 - 66 %; Ke *et al.*, 2017). En el caso de la presente investigación, las NPs CuO aplicadas durante la imbibición en dosis $\geq 25 \text{ mg L}^{-1}$ marcaron una tendencia de mayor acumulación de biomasa en sus plántulas en comparación con las plántulas control.

6.2.2 Eventos bioquímicos y fisiológicos asociados a la aplicación de nanopartículas de óxido de cobre.

Tras la determinación de las 2 dosis más representativas, es decir, la óptima y la fitotóxica (25 y 250 mg L^{-1} , respectivamente) en las pruebas de germinación y vigor. Enseguida se dará lugar a la descripción

de los potenciales eventos bioquímicos ocurridos mediante la explicación de algunas variables asociadas al estallamiento oxidativo directo provocado por la aplicación de estas dosis de NPs CuO.

El incremento en la producción de H₂O₂ en las raíces tratadas con NPs CuO, se corroboró mediante una tinción con DAB. En la figura 14 se pueden observar regiones color café, indicadoras de una acumulación de H₂O₂; siendo superiores en las raíces sometidas al tratamiento de 250 mg de NPs CuO L⁻¹.

La cuantificación de H₂O₂ intracelular fue consistente con lo observado de forma cualitativa en donde las raíces bajo tratamiento con 250 mg de NPs CuO L⁻¹, presentaron una mayor concentración de H₂O₂ (0.12 ± 0.02 μmol), significativa, equivalente a un 30 % (Cuadro 10) en comparación con el contenido de H₂O₂ en las raíces del tratamiento de 25 mg de NPs CuO L⁻¹ (0.09 ± 0.0022 μmol) y 0.7 veces con respecto al tejido control (0.07 ± 0.003 μmol; p < 0.05).

Cuadro 10. Concentración de peróxido de hidrógeno intracelular (μmoles H₂O₂) en raíces de plantas de *Cucurbita pepo* bajo estrés por nanopartículas de óxido de cobre.

Control	NPs CuO 25 mg L ⁻¹	NPs CuO 250 mg L ⁻¹
0.07 ± 0.0048 b	0.09 ± 0.0022 b	0.12 ± 0.02 a

Valores de medias y E.E con literales diferentes entre columnas denotan una diferencia estadística significativa p < 0.05. Se consideraron 5 repeticiones; N = 12.

Según Nair y Chung (2015), encontraron una correlación directa entre la concentración de las NPs CuO aplicada y la producción de H₂O₂ y éstas con la peroxidación de los lípidos de las membranas de los organelos en raíces de *Cicer arietinum* en concentraciones de NPs CuO de 200-500 mg L⁻¹ (Nair *et al.*, 2015). Una deficiente eliminación de H₂O₂ en combinación con un exceso de Cu (CuO o Cu⁺²) en el medio, puede derivar en la peroxidación de los lípidos de las membranas por una de las reacciones de Fenton (Khan *et al.*, 2019), como ocurrió en *Elodea densa* bajo exposición de NPs CuO durante 3 días en concentraciones de 5.0 mg/L⁻¹ (Rico *et al.*, 2015).

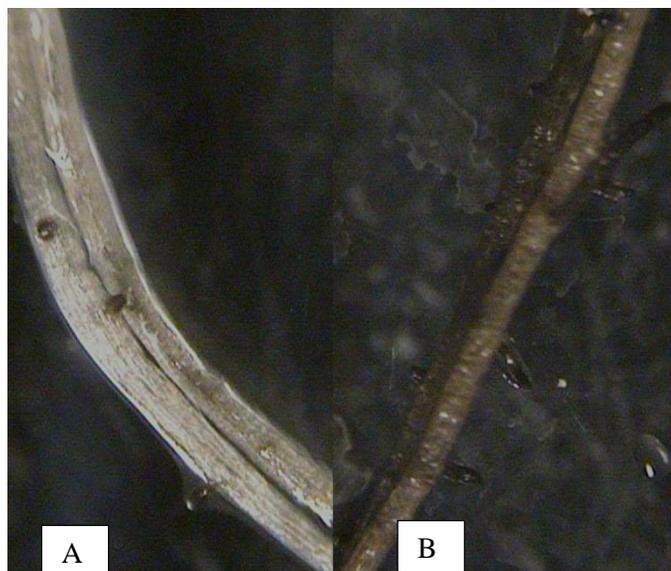


Figura 15. Tinción con diaminobencidina en raíces de *Cucurbita pepo* tratadas con nanopartículas de óxido de cobre. El color marrón denota los depósitos de H₂O₂ producido a nivel celular; a) raíces control; b) Raíces bajo estrés con nanopartículas de CuO a una concentración de 250 mg L⁻¹.

Pasando a la acumulación de fenoles totales en las raíces de *C. pepo* tratadas con NPs CuO (25 y 250 mg L⁻¹) fue menor en comparación con las plantas control (Cuadro 11). Sin embargo, haciendo una comparación entre los tratamientos elicitados, se pudo observar que en las raíces del tratamiento de 25 mg L⁻¹, se produjo una mayor cantidad ($p < 0.05$) de compuestos fenólicos, equivalente a un 11 % más (103.96 ± 3.55 µg de catequina /gPS) en comparación con las tratadas con 250 mg L⁻¹ (93.64 ± 3.14 µg de catequina /gPS; Cuadro 11).

Cuadro 11. Contenido de fenoles totales (µg de catequina /gPS) presentes en las raíces de *Cucurbita pepo* bajo tratamiento con nanopartículas de óxido de cobre.

Control	NPs CuO (25 mg L ⁻¹)	NPs CuO (250 mg L ⁻¹)
104.93 ± 2.61 a	103.96 ± 3.55 a	93.64 ± 3.14 b

Valores de medias y E.E con literales diferentes entre columnas denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Se consideraron 5 repeticiones; N = 15.

El hecho de que bajo la concentración de 25 mg L⁻¹, se produzca una cantidad similar de estos compuestos en comparación con el control, significa que esta dosis no provoca una alteración deletérea en el estado redox celular, lo cual, tiene un efecto positivo dual, ya que al haber una mayor cantidad de

compuestos fenólicos en comparación con el tratamiento de 250 mg L⁻¹; uno de los efectos va dirigido hacia la conservación de la estructura de las NPs, brindándoles estabilidad dentro de la planta, evitando con ello, la disolución en exceso de Cu⁺ / Cu⁺² (Nair *et al.*, 2015), escenario distante en tratamiento de 250 mg L⁻¹, que al verse reducida la concentración de estos compuestos es más probable tenga lugar la disolución de los iones de cobre en el medio. El otro efecto va dirigido hacia la función reductora de estos compuestos, cuando los iones mencionados (Cu⁺ / Cu⁺²) ya se encuentran en solución, formados normalmente en exceso con concentraciones altas de NPs CuO. Por ello, es importante la concentración de fenoles en la aplicación de NPs metálicas, porque evita una reacción oxidativa de mayor proporción y con ello, un episodio de estrés más prolongado que lleve a un desajuste metabólico irreversible (Siddiqui *et al.*, 2015). En cuanto a su notable disminución (compuestos fenólicos) bajo el tratamiento de 250 mg L⁻¹; puede deberse probablemente a un incremento súbito en la concentración de ABA en las raíces de *C. pepo* ante la alta concentración de NPs (González *et al.*, 2019), aunado a una alteración en la ruta de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina triptófano o tirosina, que son fundamentales y determinantes en la concentración de fenoles en las plantas (Valcarcel *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2016; Rasouli *et al.*, 2016).

6.2.3 Proteómica diferencial

En la figura 15 se muestran los perfiles proteómicos de la muestra control (15. A) en el cual se contabilizaron 697 ± 48 manchas proteicas, 500 fueron comunes a todos los geles (105 ± 14 manchas en las raíces control). Un total de 92 ± 21 manchas proteicas fueron determinados como diferenciales usando una significancia de p < 0.05. Para poder hacer el análisis se obtuvo un gel de referencia (master gel) cuyo patrón proteómico albergaba las machas proteicas más representativos de cada uno de los tratamientos (control y 250 mg de NPs CuO L⁻¹; 789 en total) y con los cuales se hizo la comparación cuantitativa y estadística (t de student al 95 %) para cada una de las repeticiones de ambos tratamientos. El perfil proteómico de las raíces elicidadas con 250 mg L⁻¹ NPs CuO obtenido albergaba 681 proteínas (Figura 15). Cabe mencionar que no fue posible realizar la secuenciación de estas proteínas.

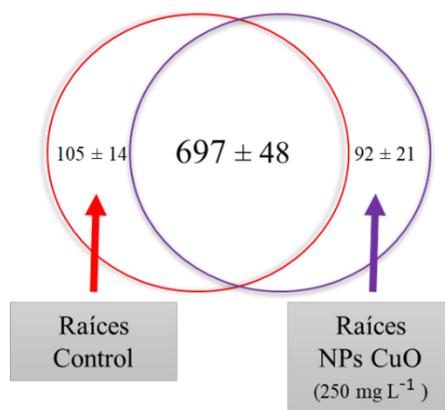


Figura 16. Diagrama de Venn de las proteínas expresadas en raíces de *Cucurbita pepo* bajo estrés con nanopartículas óxido de cobre.

No se realizó la secuenciación e identificación de proteínas debido a un incremento en el costo de los servicios requeridos, no respaldables por los fondos disponibles para este proyecto.

6.2.4 Bioensayo de siembra en sustrato: parámetros morfofisiológicos

Al realizar este bioensayo fue posible notar que al extender el periodo de crecimiento de las plantas (25 días) la dosis alta de NPs CuO (250 mg L⁻¹) tuvo un efecto de proporción diferente al observado en las pruebas de germinación (etapa de plántula). A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico realizado en variables con relación a la morfo-fisiología de las plantas de *C. pepo* expuestas a las 2 concentraciones de interés (25 y 250 mg L⁻¹) en comparación con un tratamiento control. Para posteriormente abordar los resultados de los eventos bioquímicos asociados al estado de estrés oxidativo derivado de la aplicación de las mismas dosis de NPs CuO.

El efecto tras la aplicación de NPs CuO permitió observar una tendencia en las plantas tratadas con la dosis de 25 mg L⁻¹ a incrementar la longitud radical, el área foliar, la biomasa del vástago y de manera significativa la altura de vástago ($p < 0.05$; Cuadro 12).

Con respecto a la dosis de 250 mg L⁻¹, al realizar el experimento en sustrato y al extender el periodo de desarrollo de las plantas de *C. pepo*, su efecto fitotóxico se vio disminuido, ya que en 6 de las 8 variables analizadas (longitud radical, diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, IRC y biomasa del vástago; Cuadro 12), los efectos mostrados fueron estadísticamente similares con respecto a la dosis de 25 mg L⁻¹; excepción fue el diámetro del tallo, donde la concentración más alta mostró una tendencia a superar el grosor de los tallos correspondientes a los otros tratamientos.

Cuadro 12. Respuestas morfológicas de plantas de *Cucurbita pepo* bajo la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.

Variable morfofisiológica	Control	25 mg L ⁻¹ NPs CuO	250 mg L ⁻¹ NPs CuO
Longitud de raíz	11.53 ± 1.06 a	13.26 ± 0.79 a	9.98 ± 1.17 a
Altura de tallo	14.53 ± 0.59 a	15.34 ± 0.69 a	12.57 ± 1.28 b
Diámetro de tallo	2.48 ± 0.18 a	2.36 ± 0.12 a	3.03 ± 0.29 a
Número de hojas	1.87 ± 0.10 a	2.10 ± 0.18 a	2.14 ± 0.16 a
Área foliar	20.17 ± 1.98 a	23.13 ± 1.64 a	21.17 ± 2.75 a
IRC	20.35 ± 0.56 a	20.20 ± 0.41 a	18.66 ± 1.22 a
Biomasa del vástago	964.71 ± 93.44 a	1006.14 ± 90.2 a	895.57 ± 60.96 a
Biomasa de raíz	256.80 ± 12.41 a	255.57 ± 11.48 a	171.43 ± 16.93 b

Valores de medias y E.E con literales diferentes entre columnas denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Se consideraron 5 repeticiones; N= 15.

6.2.5 Bioensayo de siembra en sustrato: Pruebas bioquímicas sobre el estado de estrés oxidativo

De forma similar al bioensayo descrito en la sección de grafeno, las NPs CuO se probaron durante la etapa vegetativa de plantas *C. pepo*, hasta los 25 días posteriores a la emergencia de la plántula. Momento en el cual, se procedió a evaluar el estado redox de las raíces mediante las pruebas bioquímicas mencionadas (contenido de H₂O₂ intracelular, actividad antioxidante y contenido de clorofila), los resultados se exponen a continuación.

Los resultados de la determinación de H₂O₂ intracelular se obtuvieron dando seguimiento a 2 proyecciones de interés; una: el estímulo que representa la presencia de las NPs sobre la concentración de H₂O₂ en las raíces cuando la dosis es óptima (25 mg L⁻¹) y la otra, cuando la dosis es fitotóxica (250 mg L⁻¹). Los niveles de esta ERO en las raíces, al momento de la aplicación de las NPs CuO, se mostraron incrementados en ambos tratamientos bajo elicitación (25 y 250 mg L⁻¹; $p < 0.01$) en comparación con las raíces control; siendo mayor en el tratamiento de 25 mg L⁻¹ (0.6 veces más H₂O₂) en comparación con las

raíces control ($0.09 \pm 0.004 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$) y sólo incrementado 0.44 veces en el tratamiento de 250 mg L^{-1} (ANOVA, $p < 0.01$; Cuadro 13). Al cabo de 12 h el estímulo fue reducido en ambos tratamientos con NPs CuO a concentraciones por debajo de las registradas en las raíces control ($0.10 \pm 0.005 \mu\text{mol}$), siendo menor las raíces correspondientes al tratamiento de 250 mg L^{-1} .

Cuadro 13. Concentración de peróxido de hidrógeno ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$) en las raíces de plantas de *Cucurbita pepo* tras la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.

	Control	NPs CuO (25 mg L^{-1})	NPs CuO (250 mg L^{-1})
0 h	0.09 ± 0.004 c	0.15 ± 0.004 a	0.13 ± 0.01 b
12 h	0.10 ± 0.005 a	0.09 ± 0.003 a	0.07 ± 0.003 b

Valores de medias y E.E con literales diferentes entre columnas denotan una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.01$). Se consideraron 5 repeticiones; $N = 30$.

Un incremento súbito en la concentración de H_2O_2 como el registrado en inicio en las raíces de *C. pepo* puede representar una señal para la activación de algunos mecanismos antioxidantes. Sin embargo, una deficiente actividad en este sentido (antioxidante) se traduce en una mayor acumulación de H_2O_2 en la célula y el apoplasto, que en combinación con un exceso de Cu (CuO o Cu^{+2}) en el medio, puede derivar en la peroxidación de los lípidos de las membranas (Rico *et al.*, 2015). Al respecto, Nair y Chung (2015), lograron una corroboración, al probar concentraciones de $200\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$ encontraron una correlación directa entre la concentración de las NPs CuO, la producción de H_2O_2 y la peroxidación de los lípidos de las membranas de los organelos en raíces de *Cicer arietinum* (garbanzo). Sin embargo, como se podrá apreciar más adelante, la presencia de H_2O_2 en las raíces de *C. pepo* crecidas en sustrato, lejos de representar un factor de inhibición en la actividad enzimática antioxidante, pudo establecerse en inicio una correlación positiva entre la actividad específica de SOD y la presencia de esta ERO; y al final del periodo considerado para el bioensayo (12 h), se observó una correlación importante en ambos sentidos; positiva con respecto a la actividad específica de POX y negativa con respecto a APX ($r = 0.90$ y -0.98 , respectivamente).

Al darle seguimiento a la respuesta antioxidante de manera más puntual ante la presencia de H_2O_2 en las raíces de *C. pepo*, se pudo registrar la actividad específica máxima (POX, APX y CAT) al cabo de 12 h de haber aplicado las NPs CuO en ambos tratamientos (25 y 250 mg L^{-1}). En el caso de POX, fue posible observar un incremento de su actividad en 0.7 y 1.4 veces dentro los tratamientos elicitados (25 y

250 mg L⁻¹, respectivamente; p < 0.01) en comparación con las raíces control (7.31 ± 0.55 UI/ mg de proteína; ANOVA; Cuadro 14).

La mayor actividad de APX se registró también bajo el tratamiento elicitado con 250 mg L⁻¹, donde al cabo de las 12 h, era 0.28 veces mayor que la del tratamiento de 25 mg L⁻¹ y 0.5 veces mayor comparada con la actividad de las raíces control (ANOVA p<0.05) – Cuadro 14-. En cuanto a la actividad de CAT, la más alta tuvo lugar en las raíces de 25 mg L⁻¹ (0.334± 0.062 UI/ mg de proteína) siendo superior un 0.4 veces con respecto a la actividad del tratamiento de 250 mg L⁻¹ (Cuadro 14) y 27% en comparación con la actividad de CAT de las raíces control (p < 0.01).

Cuadro 14. Actividad específica de Peroxidasas, Ascorbato peroxidasas, Catalasa y Superóxido dismutasa tras la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre a plantas de *Cucurbita pepo*.

	Control	NP CuO (25 mg L ⁻¹)	NP CuO (250 mg L ⁻¹)
	POX (U/ mg de proteína)		
0 h	7.27 ± 0.55 A	8.38 ± 0.54 A	7.36 ± 0.67 A
12 h **	7.25 ± 0.42 A	5.29 ± 0.63 B	4.57 ± 0.15 B
	APX (U/ mg de proteína)		
0 h	1.35 ± 0.06 B	1.52 ± 0.06 B	2.86 ± 0.44 A
12 h	1.46 ± 0.24 C	2.35 ± 0.31 B	3.29 ± 0.20 A
	CAT (U/ mg de proteína)		
0 h	0.205 ± 0.064 A	0.217 ± 0.017 A	0.221 ± 0.026 A
12 h	0.241 ± 0.036 A	0.334 ± 0.062 A	0.197 ± 0.010 A

Valores de medias y E.E con literales diferentes entre columnas denotan una diferencia estadística significativa (p < 0.05; **: p < 0.01). Se consideraron 5 repeticiones; N= 15.

La correlación directa entre la concentración de NPs CuO, H₂O₂, actividad POX y la lignificación de raíces, ya había sido reportada por (Nair *et al.*, 2015) en plantas de garbanzo; destacando que POX participa directamente en este proceso (lignificación). Algunos estudios destacan la importancia sobre el cómo la actividad de POX, tiene que ver con la adaptación de las plantas a entornos alterados con presencia de metales pesados y altas concentraciones de gases de efecto invernadero (Gupta *et al.*, 2018). Yue *et al.* (2017) encontraron una sobre-expresión de genes relacionados con una mayor actividad de POX en el apoplasto de plantas de maíz al momento de someterlas a una exposición directa con Cd, lo cual les permitió una mayor acumulación de biomasa; otro caso, fue el encontrado en plantas de *A. thaliana*, donde se pudo observar una menor acumulación de Al en las raíces, causada por la sobreexpresión de otro gen relacionado

con la actividad POX (AtPrx64), lo cual derivó en una menor cantidad de ERO y un mayor crecimiento de la raíz. (Wu *et al.*, 2017). Por otro lado, Ke *et al.* (2017) reportaron que la sobreexpresión de los genes que codifican para APX y Cu SOD se relaciona directamente con el nivel de H₂O₂.

En cuanto a la actividad específica de CAT, se encontró un patrón similar en plantas de *A. thaliana*, donde el estallamiento oxidativo derivado de la aplicación de NPs CuO en concentraciones bajas (10 mg L⁻¹) provocó una actividad CAT más alta en comparación con la registrada en las plantas bajo concentraciones mayores (> 50 mg L⁻¹; Ke *et al.*, 2017). Destacando que la actividad específica de esta enzima normalmente tiene lugar para combatir la sobreproducción de H₂O₂ durante etapas tempranas del estallamiento oxidativo (Ke *et al.*, 2017).

Pasando a la respuesta antioxidante de naturaleza no enzimática (cantidad de prolina), determinada ante el estallamiento oxidativo derivado de la aplicación de NPs CuO; pudo observarse un patrón creciente y con mayor duración a diferencia de la respuesta de naturaleza enzimática. Ésta fue similar en proporción en ambos tratamientos con NPs (25 y 250 mg L⁻¹), teniendo incrementos en la concentración de prolina a las 12 h de aplicar las suspensiones correspondientes, equivalentes a un 14.5 y 12.0 % (25 y 250 mg L⁻¹, respectivamente; ANOVA; p < 0.01), con respecto a sus concentraciones iniciales (0 h) y de 25 y 23% (25 y 250 mg L⁻¹) con respecto a la cantidad de prolina presente en las raíces control (Cuadro 15); no habiendo diferencia significativa a este momento entre los tratamientos elicitados (25 y 250 mg L⁻¹).

Cuadro 15. Contenido de prolina (µg) en raíces de *Cucurbita pepo* tras la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.

	Control	NPs CuO (25 mg L ⁻¹)	NPs CuO (250 mg L ⁻¹)
0 h	492.64 ± 9.51 a	559.75 ± 12.47 a	557.81 ± 56.84 a
12 h	489.47 ± 13.21 b	654.61 ± 58.13 a	634.25 ± 27.62 a

Valores de medias y E.E con literales diferentes entre columnas denotan una diferencia estadística significativa (p < 0.01). Se consideraron 5 repeticiones; N = 15.

Incrementos significativos de este aminoácido (2.0 veces, comparado con el control) se han encontrado también en raíces de *Oryza sativa* bajo tratamiento con NPs CuO (1000 mg L⁻¹); donde la principal función de la prolina radicaba en evitar la peroxidación de las membranas (Da Costa *et al.*, 2016) e incidir de manera directa sobre la permeabilidad de éstas (Prasad *et al.*, 2017).

El desbalance redox generado por la segunda aplicación NPs CuO impactó de manera adversa y significativa sobre la concentración de clorofila en las hojas de *C. pepo*, ya que bajo los dos tratamientos elicidados (25 y 250 mg L⁻¹), pudo observarse una reducción en sus niveles, tanto en su tipo *a*, como de clorofila *b* y total; al cabo de 12 h (Cuadro 16). Dicha reducción, en el caso de la clorofila *a* fue del 30.3 y 47.3 % ($p < 0.05$) para los tratamientos de 25 y 250 mg L⁻¹, respectivamente; en la clorofila *b* fue de 26.3 y 55.2 % (25 y 250 mg L⁻¹, respectivamente); y para la clorofila total de 28.4 y 46.6 % (25 y 250 mg L⁻¹, respectivamente); tomando como referencia su concentración inicial.

Con respecto a la cantidad de clorofila de las hojas control, se puede observar que la degradación del pigmento ocurrida en el tratamiento de 25 mg L⁻¹ fue equivalente a una reducción del 13.1, 18.6 y 14.6 %, para el contenido de clorofila *a*, *b* y total; respectivamente. Siendo más afectadas, en este sentido, las hojas bajo el tratamiento de 250 mg L⁻¹, donde la reducción del contenido de clorofila *a*, *b* y total, fue del 42.7, 38.4 y 41.4 %, respectivamente (Cuadro 16).

Cuadro 16. Contenido de clorofila *a*, *b* y total de plantas de *Cucurbita pepo* después de la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de cobre.

	Clorofila <i>a</i> (mg * mL ⁻¹)			Clorofila <i>b</i> (mg * mL ⁻¹)			Clorofila total (mg * mL ⁻¹)		
	Control	NPs CuO (25 mg L ⁻¹)	NPs CuO (250 mg L ⁻¹)	Control	NPs CuO (25 mg L ⁻¹)	NPs CuO (250 mg L ⁻¹)	Control	NPs CuO (25 mg L ⁻¹)	NPs CuO (250 mg L ⁻¹)
0 h	0.038 ± 0.001 b	0.047 ± 0.004 a	0.041 ± 0.001 b	0.018 ± 0.001 a	0.019 ± 0.001 a	0.019 ± 0.001 a	0.057 ± 0.002 a	0.065 ± 0.005 a	0.060 ± 0.002 a
12 h	0.038 ± 0.002 a	0.033 ± 0.001 b	0.022 ± 0.001 c	0.017 ± 0.001 a	0.014 ± 0.0002 b	0.011 ± 0.001 c	0.055 ± 0.002 a	0.047 ± 0.001 b	0.032 ± 0.001 c

Valores de medias y E.E con literales diferentes entre columnas denotan una diferencia estadística significativa ($p < 0.01$). Se consideraron 5 repeticiones; N = 15.

El impacto negativo de las NPs CuO sobre la biosíntesis de clorofila ya ha sido reportado; donde las principales atribuciones son debidas a la naturaleza metálica de las NPs (tamaño/concentración) y a la liberación excesiva de iones (Cu⁺ y Cu²⁺; Rico *et al.*, 2015). Ke *et al.* (2017) han reportado reducciones significativas (50-70 %) en este pigmento al emplear concentraciones superiores a 50 mg L⁻¹, donde las NPs CuO incidieron directamente sobre las reacciones fotoquímicas del PSII, reduciendo significativamente la conversión de energía (fotón - electrón) requerida en este fotosistema (Rico *et al.*, 2015). Evaluando concentraciones más altas (hasta de 10 g L⁻¹), no sólo fue corroborada la degradación de la clorofila como efecto de las NPs CuO, además provocaron alteraciones estructurales y funcionales en el estroma, los tilacoides (reduciendo su número) y las grana (Rebeiz, 2014; Rico *et al.*, 2015).

En la relación prolina-clorofila, Demidchik (2015) reportó que al encontrarse incrementada la síntesis de prolina, se reduce la actividad del ciclo de Calvin para prevenir la oxidación del NADPH y a la vez, mantener la disponibilidad de NADP⁺ como receptor de electrones en el PSI bajo una condición de estrés, lo que permitiría la continuidad del flujo de electrones dentro de dicho fotosistema y con ello, como se mencionó previamente, evitar la acumulación de ERO como ¹O₂ y O₂⁻ (Kaur *et al.*, 2015), evitando un desbalance redox abrupto que pudieran afectar la concentración de clorofila y con ello, la eficiencia fotosintética (Lodeyro *et al.*, 2015); en el caso del presente trabajo realizado con *C. pepo*, si bien pudo percibirse una relación de este tipo al inicio del experimento (0 h), al final la concentración de clorofila disminuyó de manera considerable, no así la de prolina.

7. Conclusiones

Cambios en la morfo-fisiología de *C. pepo*, derivados de la aplicación de los NMs probados, se observaron principalmente en la raíz, órgano que mostró modificaciones en su estructura en las concentraciones mayores (1000 mg L^{-1} grafeno y 250 mg L^{-1} NPs CuO).

Al aplicar grafeno, se observó una inducción de raíces secundarias, incremento en la densidad pelos radicales, estos cambios acompañados con un incremento en compuestos fenólicos, así como una alteración de proteínas asociadas a la alteración del estado redox en las células del sistema radicular, activando la dinámica de señalización (MAPK) y el transporte a través de las membranas de agua, favoreciendo cambios en la conformación de la pared celular en favor de su expansión y lignificación. Cuando el grafeno fue adicionado posteriormente en la etapa vegetativa (25 dde), indujo un mayor vigor a las plántulas, donde los cambios observados en la morfo-fisiología pueden ser derivados de la presencia de H_2O_2 , siendo esta ERO la responsable de la activación de la ruta de señalización para la síntesis de fitorreguladores.

Las NPs CuO indujeron también a un mayor vigor en las plántulas, pero a concentraciones menores (25 mg L^{-1}), incrementando esta concentración 10 veces (250 mg L^{-1}), los efectos fueron adversos, ya que provocó una reducción importante en todas las variables evaluadas a los 8. La aplicación foliar de estas NPs activó el sistema antioxidante de la planta la cual respondió al estímulo bajo ambas concentraciones (25 y 250 mg L^{-1}). El estado de equilibrio biológico funcional fue alterado y no recuperado después de 12 h de la aplicación vía foliar, la actividad específica enzimática fue rebasada, ya que se redujo significativamente, afectando también el estado de oxidación prevalente, al contenido de clorofila, sin embargo la compensación antioxidante se percibió de una fuente no enzimática, mediante incrementos significativos en la concentración de prolina en las plantas tratadas con NPs, relacionándose de manera inversa con las anteriores.

El incremento en vigor derivado de la aplicación de los NMs a los 25 dde, les permite a las plantas de calabaza tener mayor probabilidad de expresar su máximo potencial genético productivo, una vez alcanzadas las etapas posteriores de desarrollo, o bien, al ser trasladadas a campo.

8. Perspectivas

Es recomendable evaluar a detalle los cambios en la morfología radical, para establecer su correlación con el contenido de auxinas tras la aplicación de los NM propuestos, para poder definir con precisión el grado de interacción entre éstos.

Por otro lado, también es recomendable dar seguimiento al experimento hasta una fase reproductiva de la planta de calabacita, para poder vislumbrar el efecto del grafeno en esta fase tan importante.

9. Bibliografía

Abraham E., Hourton C., Erdei L., Szabados L. (2010). Methods for determination of proline in plants. En: *Plant stress tolerance methods and protocols* (Ed. Sunkar R.) pp: 317-328. New York: Humana Press.

Adhikari T. (2012). Effect of copper oxide nano particle on seed germination of selected crops. *Journal of agricultural science and technology* pp: 815-823.

Agrawal C., Sen S., Chatterjee A., Rai S., Yadav S., Singh S., Rai L. (2015). Signal perception and mechanism of salt toxicity/tolerance in photosynthetic organisms: cyanobacteria to plants. En: *Stress responses in plants. mechanisms of toxicity and tolerance* pp: 79-105. Cham: Springer international publishing.

Ahmad P. y Prasad M. (2012). *Abiotic stress responses in plants-metabolism, productivity and sustainability*. New York: Springer science.

Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (2016). *Advances in plant breeding strategies: agronomic, abiotic and biotic stress traits. Volume 2*. New York: Springer international publishing.

Andon N., Hollingworth S., Koller A., Yates J., Haynes P. (2002). Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry. *Proteomics* pp: 1156-1168.

Anjum N., Singh N., Singh M., Sayeed I., Duarte A., Pereira E., Ahmada I. (2014). Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.). *Science of the total environment* pp: 834–841.

Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* pp: 373-399.

Arruda C., Silva D., Galazzi M., Azevedo A., Arruda Z. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* pp: 693-705.

Aydin G. (2016). Genome analysis of plants. En: *Plant omics: Trends and applications* (Ed. Hakeem K.) pp: 1-14. Cham: Springer international publishing.

Bao G. (2013). Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annual review of biomedical engineering* pp: 253-273.

Barh D., Khan M., Davies E. (2015). *Plant Omics: The omics of plant science*. New Delhi: Springer India.

Barku V., Boye A., Ayaba S. (2013). Phytochemical screening and assessment of wound healing activity of the leaves of *Anogeissus leiocarpus*. *European journal of experimental biology* pp: 18-25.

Barrios C., Rico M., Trujillo J., Medina A., Peralta J., Gardea J. (2016). Effects of uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate, and citric acid on tomato plants. *Science of the total environment* pp: 956-964.

Battye W., Aneja V., Schlesinger W. (2017). Is nitrogen the next carbon? *Earth's future* pp: 894–904.

Bewley J., Bradford K., Hilhorst H., Nonogaki H. (2013). *Seeds physiology of development, germination and dormancy. Third edition.* New York: Springer science.

Bhoomika K., Pyngrope S. (2013). Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum. *Plant growth regulation* pp: 235–252.

Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2012). *Biochemistry and molecular biology of plants.* Rockville: American society of plant biologists.

Buxbaum E. (2015). *Fundamentals of protein structure and function.* New York: Springer international publishing.

Chen Z., Gu Q., Yu X., Huang L., Xu S., Wang R., Shen W. (2018). Hydrogen peroxide acts downstream of melatonin to induce lateral root formation. *Annals of botany* pp: 1127-1136.

Chen L., Yang S., Liu Y., Mo M., Guan X., Huang L., Chang L. (2018a). Toxicity of graphene oxide to naked oats (*Avena sativa* L.) in hydroponic and soil cultures. *RSC Advances* pp: 15336-15343.

Chen Y., Wang D., Zhu X., Zheng X. Feng L. (2012). Long-term effects of copper nanoparticles on wastewater biological nutrient removal and N₂O generation in the activated sludge process. *Environmental Science and Technology* pp: 12452–12458.

Chen L., Song Y., Li S., Zhang L., Zou C., Yu D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et biophysica Acta* pp: 120-128.

Cheyrier V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry reviews* pp: 153–177.

Chhipa H. (2017). Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. *Environmental chemistry letters* pp: 15-22.

Corpas F. (2015). What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes? *Plant biology* pp: 1099–1103.

Corpas F., Barroso J., Palma J., Ruiz M. (2017). Plant peroxisomes: A nitro-oxidative cocktail. *Redox biology* pp: 535–542.

Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L. (2013). Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* pp: 3339–3349.

Courtney G., Pencharz P. (2016). Sulfur amino acids metabolism from protein synthesis to glutathione. *The molecular nutrition of amino acids and proteins* pp: 265-286.

Da Costa M., Sharma P. (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica* pp: 110-119.

Das K., Roychoudhury A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science* pp: 1-13.

Daudi A., Cheng Z., O'Brien A., Mammarella N., Khan S., Ausubel M., Bolwell P. (2012). The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant cell* pp: 275-287.

Demidchik V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and experimental botany* pp: 212–228.

Dimkpa C., McLean L., Britt J., Johnson W., Boyanov M., Anderson A. (2012). CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of nanoparticle research* pp: 1–14.

Dimkpa C., McLean J. (2015). Nano-CuO and interaction with nano-ZnO or soil bacterium provide evidence for the interference of nanoparticles in metal nutrition of plants. *Ecotoxicology* pp: 119-129.

Dixon D., Laphorn A., Edwards R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome biology* pp: 1-10.

Du W., Yin Y., Guo, H. (2017). Review. Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: Physiological and biochemical aspects. *Plant physiology and biochemistry* pp: 210-225.

Elavarthi S., Martin B. (2010). Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. En: *Plant Stress Tolerance* pp: 273-280. Humana Press.

El-Maarouf H., Sajjad Y., Bazin J., Langlade N., Cristescu S., Balzergue S., Bailly C. (2015). Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant, cell and environment* pp: 364–374.

Engin Y., Cengiz T., Bulent U. (2015). Traits for phenotyping. En: *Phenomics in crop plants: Trends, options and limitations* (Ed. Kumar J.) pp: 11-21. New Delhi: Springer India.

Eremina M., Rozhon W., Yang S., Poppenberger B. (2015). ENO2 activity is required for the development and reproductive success of plants, and is feedback-repressed by AtMBP-1. *The plant journal* pp: 895–906.

Fang T., Cao Z., Li J., Shen W., Huang L. (2014). Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. *Plant physiology and biochemistry* pp: 44-51.

FAO. (2017). *FAOSTAT*. Obtenido de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

- FAO. (2017). El futuro de la alimentación y la agricultura: Tendencias y desafíos.
- Fernández C., Alemano S., Vigliocco A., Andrade A., Abdala G. (2012). Stress hormone levels associated with drought tolerance vs. sensitivity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). En: *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants* (Ed. Anjum N.) pp: 249-274. Berlin: Springer-Verlag.
- Fontes N., Delrot S., Geros H. (2010). A Method for the Isolation of Protoplasts from Grape Berry Mesocarp Tissue. *Recent Patents on Biotechnology* pp: 125-129.
- Franks P., Farquhar G. (2007). The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant physiology* pp: 78-87.
- Freitag S. (2015). Multimodal characterization of graphene. *Microscopy and microanalysis* pp: 575-576.
- García A., Sparks J., Blancaflor E. (2018). Plant actin cytoskeleton: New functions from old scaffold. En: *Concepts in cell biology history and evolution* (Ed. Sahi V., Baluška F.) pp: 103-125. Cham: Springer international publishing AG.
- Garnett, C. (2007). Biodistribution of Nanoparticles: Insights from Drug Delivery. En: (Ed. Monteiro N., Lang C) *Nanotoxicology: Characterization, Dosing, and Health Effects*. Informa Healthcare, New York, USA pp. 85–98.
- Gerth K., Lin F., Daamen F., Menzel W., Heinrich F., Heilmann M. (2017). Arabidopsis phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 2 contains a functional nuclear localization sequence and interacts with alpha-importins. *The plant journal* pp: 862–878.
- Ghorbanpour M. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon* pp: 749–759.
- Giordano D. Schubert A. (2016). Characterization of a multifunctional caffeoyl-CoA O methyl transferase activated in grape berries upon drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* pp: 23-32.
- González V., Cohen J., Reyes D. (2019). Abscisic acid is involved in phenolic compounds biosynthesis, mainly anthocyanins, in leaves of *Aristotelia chilensis* plants (Mol.) subjected to drought stress. *Physiologia plantarum*, pp: 855–866.
- Gregorczyk K., Knez M. (2016). Hybrid nanomaterials through molecular and atomic layer deposition: Top down, bottom up, and in-between approaches to new materials. *Progress in materials science* pp: 1-37.
- Grillo R., Rosa H., Fraceto F. (2015). Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. *Chemosphere* pp: 608-619.
- Gupta D., Igamberdiev A. (2015). *Signaling and communication in plants reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants*. Volume 23. New York: Springer international publishing.

Gupta D., Shekhar S., Agrawal L. (2015a). Plant proteomics: Technologies and applications. En: *Plant Omics: The omics of plant science* (Ed. Barh D.) pp: 215-300. New Delhi: Springer India.

Gupta D., Corpas F. (2016). *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Switzerland: Springer international publishing.

Gupta D., Palma J., Corpas F. (2018). *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Cham: Springer international publishing AG.

Haq I., Ijaz S. (2019). Use of Metallic Nanoparticles and Nanoformulations as Nanofungicides for Sustainable Disease Management in Plants. *Nanobiotechnology in Bioformulations* pp: 289-316.

Hatami M. (2017). Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. under well-watered and water-stressed conditions. *Ecotoxicology and environmental safety* pp: 274–283.

He Y., Hu R., Zhong Y., Zhao X., Chen Q., Zhu H. (2018). Graphene oxide as a water transporter promoting germination of plants in soil. *Nano research* pp: 1928–1937.

Hinoux D., Bangash A., Meyer J., Reichheld P. (2016). Nuclear thiol redox systems in plants. *Plant science* pp: 84–95.

Hörtensteiner S., Kräutler B. (2010). Review: Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et biophysica acta* pp: 977–988.

Hossain Z., Mustafa G., Komatsu S. (2015). Plant responses to nanoparticle stress. *International journal of molecular sciences* pp: 26644-26653.

Hu X., Kang J., Lu K., Zhou R., Mu L., Zhou Q. (2014). Graphene oxide amplifies the phytotoxicity of arsenic in wheat. *Scientific reports* pp: 1-10.

Hu, X. y Zhou, Q. (2014). Novel hydrated graphene ribbon unexpectedly promotes aged seed germination and root differentiation. *Scientific reports*, 4, 3782.

Hu X., Gao Y., Fang Z. (2016). Integrating metabolic analysis with biological endpoints provides insight into nanotoxicological mechanisms of graphene oxide: From effect onset to cessation. *Carbon* pp: 65-73.

Huyi H., Long F. (2018). Regulation of gaseous signaling molecules on proline metabolism in plants. *Plant cell reports* pp: 387–392.

IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change. (2014). *Climate change 2014*. Génova: IPCC.

International Seed Testing Association (ISTA). (2014). *International rules for seed testing*. Bassersdorf, Switzerland: ISTA.

Jordan J., Singh K., Carrell J. (2018). Carbon-based nanomaterials elicit changes in physiology, gene expression, and epigenetics in exposed plants: A review. *Current opinion in environmental science & health* pp: 29–35.

Jovanović S., Kukavica B., Vidović M., Morina F., Menckhoff L. (2018). Class III peroxidases: Functions, localization and redox regulation of isoenzymes. En: *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (Ed. Gupta D., Palma J., Corpas F.) pp: 269-284. Cham: Springer International Publishing AG.

Kähkönen M., Hopia A., Heinonen M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Agricultural and food chemistry* pp: 3954-3962.

Karn, B., Sadik, O., Gardea-Torresdey, J., & Keller, A. (2018). Nanotechnology Research with Sustainability Considerations. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* pp: 15876–15876.

Katoch R. (2011). Chapter 10: Enzymes in metabolism. En: *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology* (Ed. Katoch R.) pp: 181-191. New York: Springer science.

Kaur G., Asthir B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia plantarum* pp: 609-619.

Kaur C., Sharma S., Singla S., Kumar S. (2015) Methylglyoxal, triose phosphate isomerase, and glyoxalase pathway: Implications in abiotic stress and signaling in plants. En: *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants. Functional Genomics Perspectives, Volume 1* (Pandey G.) pp: 347-365. New York: Springer science.

Kaveh R., Li Y., Ranjbar S., Tehrani R., Brueck C., Van Aken B. (2013). Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environmental science & technology* pp: 10637–10644.

Ke M., Zhu Y., Zhang M., Gumai H., Zhang Z., Xu J., Qian H. (2017). Physiological and molecular response of *Arabidopsis thaliana* to CuO nanoparticle (nCuO) exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* pp: 713–718.

Khan Z., Upadhyaya H. (2019). *Impact of nanoparticles on abiotic stress responses in plants: An overview. In: Nanomaterials in plants, algae and microorganisms.* Academic press.

Khodakovskaya M. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small* pp: 115-123.

Kole C., Kumar D., Khodakovskaya M. (2016). *Plant nanotechnology. Principles and practices.* Switzerland: Springer International Publishing.

Kruger N. (2009). The Bradford method for protein quantitation. En: *The protein protocols handbook* (Ed. Walker J.) pp: 17-24. New York: Springer.

Kumar J. Kumar S., (2015). Plant Phenomics: An overview. En: *Phenomics in crop plants: trends, options and limitations* (Ed. Kumar J.) pp: 1-7. New Delhi: Springer India.

Kwak S., Kim S., Lee M., Jung K., Park I., Liu J. (1995). Acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry* pp: 981-984.

Lahiani M., Dervishi E., Chen J., Nima Z., Gaume A., Biris A., Khodakovskaya M. (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Applied materials & interfaces* pp: 7965-7973.

Lahiani M., Nima Z., Villagarcia H., Biris A., Khodakovskaya M. (2018). Assessment of effects of the long-term exposure of agricultural crops to carbon nanotubes. *Journal of agricultural and food chemistry* pp: 6654-6662.

Leung D. (2018). Studies of catalase in plants under abiotic stress. En: *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (Ed. Gupta D., Palma J., Corpas F.) pp: 27-36. Cham: Springer international publishing.

Lee W., An Y., Yoon H. Kweon H. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* pp: 1915–1921.

Lira R., Méndez B. (2016). Agronanotecnología. *Nueva frontera de la revolución verde*.

Lira R., Méndez B. (2018). Nanotecnología: Un nuevo paradigma científico en la producción agropecuaria del siglo XXI. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* pp: 1-2.

Liu R., Lal R. (2015). Review. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the total environment* pp: 131-139.

Liu S., Wei H., Li Z., Li S., Yan H., He Y. Tian, Z. (2015). Effects of graphene on germination and seedling morphology in rice. *Journal of nanoscience and nanotechnology* pp: 2695-2701.

Liu Q., Zhang B., Lin S., Baker J., Chen S., Xue P., Zheng G. (2017). Enhancement of nucleoside production in *Hirsutella sinensis* based on biosynthetic pathway analysis. *Hindawi-BioMed research international* pp: 1-11.

Liu J., Niu Y., Zhang J., Zhou Y., Ma Z., Huang X. (2018). Ca²⁺ channels and Ca²⁺ signals involved in abiotic stress responses in plant cells: recent advances. *Plant cell, tissue and organ culture* pp: 413–424.

Lodeyro A., Carrillo N. (2015). Salt stress in higher plants: mechanisms of toxicity and defensive responses. En: *Stress responses in plants. mechanisms of toxicity and tolerance*. (Ed. Tripathi B., Müller M.) pp: 1-21. Cham: Springer international publishing Switzerland.

López-Bucio J., Ramírez A., Herrera L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology* pp: 280-287.

Lynch, J. (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant physiology* pp: 7-13.

Ma H., Luo R. (2015). Biochemical characterization of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase from wheat. *Planta* pp: 113–122.

Ma F., Wang L., Li J., Samma K., Xie Y., Wang R., Shen W. (2014). Interaction between HY1 and H₂O₂ in auxin-induced lateral root formation in Arabidopsis. *Plant molecular biology* pp: 49-61.

Ma W., Wang J., Li Y., Wang X. (2018). Cysteine synthase A overexpression in *Corynebacterium glutamicum* enhances L-isoleucine production. *Biotechnology and applied biochemistry* pp: 74-81.

Malandrakis A., Kavroulakis N., Chrysikopoulos V. (2019). Use of copper, silver and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens. *Science of The Total Environment* pp: 292-299.

Manceau A., Nagy L., Marcus A., Lanson M., Geoffroy N., Jacquet T. Kirpichtchikova, T. (2008). Formation of metallic copper nanoparticles at the soil-root interface. *Environmental Science and Technology* pp: 1766–1772.

Mantri N., Patade V., Penna S., Ford R., Pang E. (2012). Abiotic stress responses in plants: Present and future. En: *Abiotic stress responses in plants-metabolism, productivity and sustainability* (Ed. Ahmad P y Prasad M.) pp: 1-21. New York: Springer science.

Margenot A., Rippner D., Dumlaio M., Nezami S., Green P., Parikh S., McElrone A. (2018). Copper oxide nanoparticle effects on root growth and hydraulic conductivity of two vegetable crops. *Plant Soil* pp: 333–345.

Marschner P. (2011). *Mineral nutrition of higher plants. 3rd edition*. San Francisco: Academic Press.

Martin R., Pluskota W., Nonogaki H. (2010). Seed germination. En: *Plant developmental biology. Biotechnological perspectives: Volume 1*. (Ed. Pua E. y Davey M.) pp: 383-395. New York: Springer-Verlag.

Martínez-Fernández D., Barroso D., Komárek M. (2016). Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environmental Science and Pollution Research* pp: 1732–1741.

Mei Y., Chen H., Shen W., Shen W., Huang L. (2017). Hydrogen peroxide is involved in hydrogen sulfide-induced lateral root formation in tomato seedlings. *BMC plant biology* pp: 1-12.

Merck KGaA. (2018). *TRI Reagent® Protocol*. Obtenido de: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/tri-reagent.html>.

Millipore Corporation. (2019). *User Guide for ZipTip®*. Darmstadt, Alemania.

Mishra D., Shekhar S., Singh D., Chakraborty S., Chakraborty N. (2018). *Heat shock proteins and abiotic stress tolerance in plants. in regulation of heat shock protein responses* pp: 41-69. Springer, Cham.

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants y stress tolerance. *Trends in Plant Science* pp: 405-410.

Mittler R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science* pp: 11-18.

Mosa A., Ismail A., Helmy M. (2017). *Plant stress tolerance an integrated omics approach*. Cham: Springer International Publishing.

Mosa A., El-Naggar M., Ramamoorthy K., Alawadhi H., Elnaggar A., Wartanian S., Hani H. (2018). Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Frontiers in plant science* pp: 1-12.

Moukrad N., Filali R., Daou I., Zegaoui O. (2014). Phytotoxic activity of the zinc oxide nanoparticles synthesized from different precursors on germination and radicle growth of seeds *Lepidium sativum*. *International Journal of Scientific and Research Publications* pp: 1-5.

Nair R., Mohamed S., Gao W., Maekawa T., Yoshida Y., Ajayan M. Kumar S. (2012). Effect of carbon nanomaterials on the germination and growth of rice plants. *Journal of nanoscience and nanotechnology* pp: 2212-2220.

Nair P. y Chung M. (2014). Impact of copper oxide nanoparticles exposure on *Arabidopsis thaliana* growth, root system development, root lignification and molecular level changes. *Environmental Science Pollution Research* pp: 12709–12722.

Nair P., Chung I. (2015). Changes in the growth, redox status and expression of oxidative stress related genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to copper oxide nanoparticle exposure. *Journal of Plant Growth Regulation* pp: 350–361.

Naser V., Shani E. (2016). Auxin response under osmotic stress. *Plant molecular biology* pp: 661–672.

Nasir A., Kausar A. (2015). A review on material derived from polystyrene and different types of nanoparticles. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* pp: 1819-1849.

Nelson L. y Cox M. (2004). *Lehninger. Principles of Biochemistry (fourth edition)*. Wisconsin: W.H. Freeman.

Park S. y Yeh A. (2016). Multi-walled carbon nanotubes and silver nanoparticles differentially affect seed germination, chlorophyll content, and hydrogen peroxide accumulation in carrot (*Daucus carota* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* pp: 257–262.

Passam C., Karapanos C., Bebeli J. Savvas D. (2007). A review of recent research on tomato nutrition, breeding and post-harvest technology with reference to fruit quality. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* pp: 1–21.

Prasad R., Kumar M., Kumar V. (2017). *Nanotechnology- An agricultural paradigm*. Singapore: Springer Nature.

Qin G., Gu H., Zhao Y., Ma Z., Shi G., Yang Y., Qu L. (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* pp: 2693–2704.

Qing W., Hong S., Qing D., Tian S., Zhong J., Yu H., Yu Y. (2016). The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants. *Plant Biotechnology Journal* pp: 1986–1997.

Raja V., Majeed U., Kang H., Andrabi I., John R. (2017). Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany* pp: 142–157.

Rajput V., Minkina T., Suskova S., Fedorenko A. (2018). Effects of copper nanoparticles (CuO NPs) on crop plants: A mini review. *Bionanoscience* pp: 36-42.

Raliya R., Saharan V., Dimkpa C., Biswas P. (2018). Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture: Current state and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* pp: 6487–6503.

Rao R., Bajaj N., Pardeshi A., Aghav S. (2012). Investigation of nanoporous colloidal carrier for solubility enhancement of cefpodoxime proxetil. *Journal of Pharmacy Research* pp: 2496-2499.

Rashid M., Iwasaki H., Oogai S., Fukuta M., Parveen S., Hossain M., Oku H. (2018). Molecular characterization of cytosolic cysteine synthase in *Mimosa pudica*. *Journal of Plant Research* pp: 319–329.

Rasouli H., Farzaei H., Mansouri K., Mohammadzadeh S., Khodarahmi R. (2016). Plant cell cancer: may natural phenolic compounds prevent onset and development of plant cell malignancy? A literature review. *Molecules* pp: 1-26.

Rebeiz C. (2014). *Chlorophyll biosynthesis and technological applications*. Dordrecht: Springer Science.

Rico C., Peralta J., Gardea J. (2015). Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. En: *Nanotechnology and plant sciences. nanoparticles and their impact on plants* (Ed. Siddiqui M., Al-Whaibi M., Mohammad F.) pp: 1-14. Cham: Springer International Publishing.

Rouhier N., Cerveau D., Couturier J., Reichheld P., Rey P. (2015). Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta* pp: 1479–1496.

Romero C., Aroca Á., Laureano M., Moreno I., García I., Gotor C. (2014). Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* pp: 264-276.

Rout G., Das A. (2013). *Molecular stress physiology of plants*. New York: Springer India.

Sabir S., Arshad M., Seema S., Satti H., Batool T., Farqaulit F., Chaudhari K. 2018. Effect of green synthesized copper nanoparticles on seed germination and seedling growth in wheat. *Int. J. Biosci* pp: 28-35.

Shah V. y Belozeroва I. (2009). Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seed. *Water Air and Soil Pollution* pp: 143–148.

Sahi P., Baluška F. (2018). *Concepts in cell biology history and evolution*. Cham: Springer International Publishing AG.

Shahzad M., Khan A., Khalid M., Gul A. (2016). Plant proteomics: An overview. En: *Plant omics: Trends and applications* (Ed. Rehman H.) pp: 295-367. Switzerland: Springer International Publishing.

Shang Y., Hasan M., Ahammed J., Li M., Yin H., Zhou J. (2019). Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. *Molecules* pp: 2558-2568.

Shen S., Liu Y., Wang F., Yao G., Xie L., Xu B. (2018). Graphene Oxide Regulates Root Development and Influences IAA Concentration in Rice. *Journal of Plant Growth Regulation* pp: 1-8.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* pp: 850–858.

Siddiqui M., Al-Whaibi M., Mohammad F. (2015). *Nanotechnology and plant sciences. nanoparticles and their impact on plants*. Cham: Springer International Publishing Switzerland.

Sigma-Aldrich. (2014). 19160 SOD determination kit. St. Louis, Missouri, E.U.

Singh S., Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* pp: 909-930.

Singh A., Singh B., Hussain I., Singh H., Yadav V. (2017). Synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its impact on germination of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. *Tropical Plant Biology* pp: 246-253.

Skoda M., Dudek I., Jarosz A., Szukiewicz D. (2014). Graphene: One material, many possibilities—application difficulties in biological systems. *Journal of Nanomaterials* pp: 1-11.

Staswick P., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M., Suza W. (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* pp: 616–627.

Sun L. (2019). Structure and Synthesis of Graphene Oxide. *Chinese Journal of Chemical Engineering* pp: 1-25.

Sunkar R. (2010). *Plant stress tolerance-methods and protocols-*. New York: Humana Press.

Suriyaprabha R. (2014). Application of silica nanoparticles in maize to enhance fungal resistance. *IET nanobiotechnology* pp: 133–137.

Szabados L., Saviouré A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* pp: 89-97.

Tang L. Wang Y. (2015). The graphene/nucleic acid nanobiointerface. *The Royal Society of Chemistry* pp: 6954-6980.

Trinidad J., Grajo H., Abucay J., Kohli Jr., Kohli A. (2016). Cereal root proteomics for complementing the mechanistic understanding of plant abiotic stress tolerance. En: *Agricultural proteomics volume 2: Environmental stresses* (Ed. Salekdeh G.) pp: 19-39. Switzerland: Springer International Publishing.

Tsukagoshi H. (2016). Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Current Opinion in Plant Biology* pp: 57-63.

Ueki S., Citovsky V. (2014). Plasmodesmata-associated proteins. *Plant Signaling and Behavior* pp: 1-10.

UniProt Consortium. (6 /09 /2018). *UniProt*. Obtenido de Proteomes results: <https://www.uniprot.org/proteomes/>.

Vajtai R. (2013) Science and Engineering of Nanomaterials. En: *Springer Handbook of Nanomaterials* (Ed. Vajtai R.) pp: 10-120. Springer Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg.

Valcarcel J., Reilly K., Gaffney M., O'Brien M. (2015). Levels of potential bioactive compounds including phenolic compounds and expression of their cognate biosynthetic genes vary significantly in different varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown under uniform cultural condition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* pp: 1018–1026.

Van Emden F. (2017). *Aphids as crop pests*. Boston: CAB international.

Vera I. (2015). Monoterpenoid indole alkaloids and phenols are required antioxidants in glutathione depleted *Uncaria tomentosa* cultures. *Frontiers in Environmental Science* pp: 1-11.

Verslues P. E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.-K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* pp: 523–539.

Wang Y. (2011). Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology* pp: 205-212.

Wang Z. (2012). Xylem- and Phloem-Based Transport of CuO Nanoparticles in Maize (*Zea mays* L.). *Environmental Science & Technology* pp: 4434–4441.

Wijesena N., Tissera N., Kannangara Y., Lin Y., Silva N. (2015). A method for top down preparation of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Carbohydrate Polymers* pp: 731-738.

Wu Y. (2017). Overexpression of a peroxidase gene (AtPrx64) of *Arabidopsis thaliana* in tobacco improves plant's tolerance to aluminium stress. *Plant Molecular Biology* pp: 157–168.

Xia Y., Liu J., Wang Y., Zhang X., Shen Z., Hu Z. (2018). Ectopic expression of *Vicia sativa* caffeoyl-CoA O-methyltransferase (VsCCoAOMT) increases the uptake and tolerance of cadmium in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany* pp: 47–53.

Yasmeen F., Raja N., Razzaq A., Komatsu S. (2017). Proteomic and physiological analyses of wheat seeds exposed to copper and iron nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* pp: 28-42.

Yin L. (2018). Effects of graphene oxide and/or Cd²⁺ on seed germination, seedling growth, and uptake to Cd²⁺ in solution culture. *Water, Air, and Soil Pollution* pp: 1-12.

Yoon J., Kwaka I., Lee M., Holden P., Joo An Y. (2014). Zinc oxide nanoparticles delay soybean development: A standard soil microcosm study. *Ecotoxicology and environmental safety* pp: 131-137.

- Yruela I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* pp: 145–156.
- Yuan J. y Dai H. (2017). Sewage sludge-based functional nanomaterials: development and applications. *Environmental science: Nano* pp: 17-26.
- Yue R. (2017). Transcriptome analysis of cadmium-treated roots in maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in plant science* pp: 1298-1307.
- Zargar S., Zargar M. (2018). *Abiotic stress-mediated sensing and signaling in plants: An omics perspective*. Singapore: Springer nature.
- Zhang J., Terrones M., Park R., Mukherjee R., Monthieux M., Koratkar N., Bianco A. (2016). Carbon science in 2016: Status, challenges and perspectives. *Carbon* pp: 708-732.
- Zhang M., Gao B., Chen J., Li Y. (2015). Effects of graphene on seed germination and seedling growth. *Journal of nanoparticle research* pp: 75- 81.
- Zhang P., Zhang R., Fang X., Song T., Cai X., Liu H., Du S. (2016). Toxic effects of graphene on the growth and nutritional levels of wheat (*Triticum aestivum* L.): short- and long-term exposure studies. *Journal of hazardous materials* pp: 543–551.
- Zhao S., Wang Q., Zhao Y., Rui Q., Wang D. (2015). Toxicity and translocation of graphene oxide in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental toxicology and pharmacology* pp: 145–156.
- Zhao L., Peralta-Videa J., Varela-Ramirez A., Castillo-Michel H., Li C., Zhang J., Gardea-Torresdey J. (2012). Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO₂ NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. *Journal of hazardous materials* pp: 131-138.
- Zita G. (2013). *Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la enzima ACCasa*. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Zuverza N., Martínez D., Du W., Hernández J., Bonilla N., López M., Gardea J. (2016). Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses. A review. *Plant physiology and biochemistry* pp: 236-264.

10. ANEXO

A0: *Cucurbita pepo*. Variedad: Zucchini



Figura A0. Planta de *C. pepo* en etapa de producción.

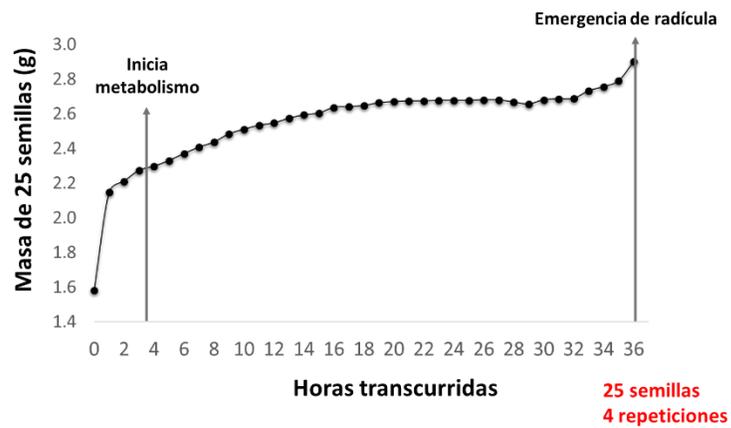
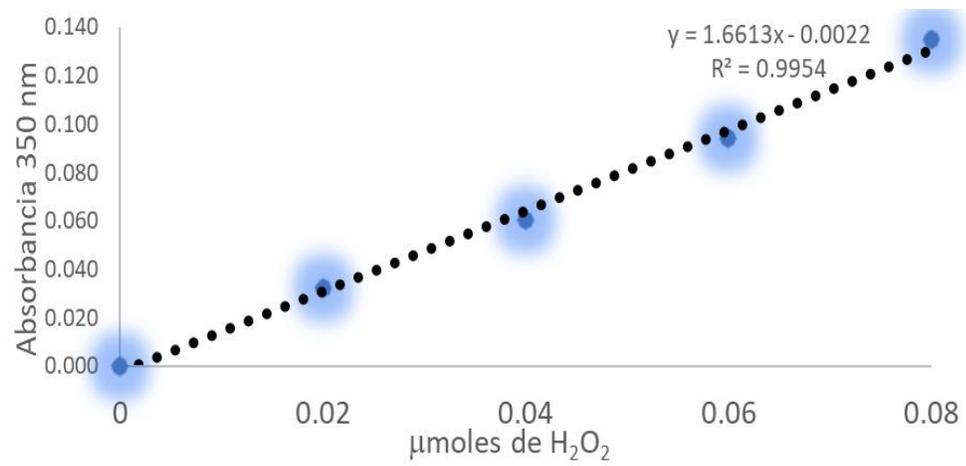


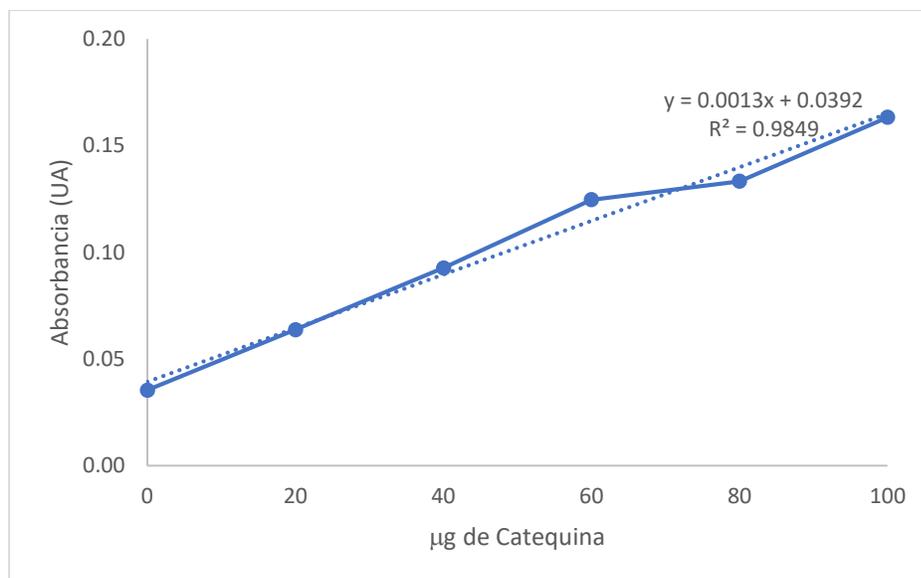
Figura A1. Curva de imbibición de las semillas de *C. pepo*



Figura A1. Acomodo de las plántulas de *C. pepo* sobre la hoja de papel Anchore.



A.2. Estandarización del ensayo para la determinación de peróxido intracelular.



A.3. Curva estándar de catequina para la determinación de fenoles totales con el reactivo *Folin-Ciocalteu*.

A.4. Fórmula para el cálculo del % de inhibición de SOD:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(\text{Abs } b1 - \text{Abs } b3) - (\text{Abs muestra} - \text{Abs } b2)}{\text{Abs } b1 - \text{Abs } b3} \right] \times 100$$

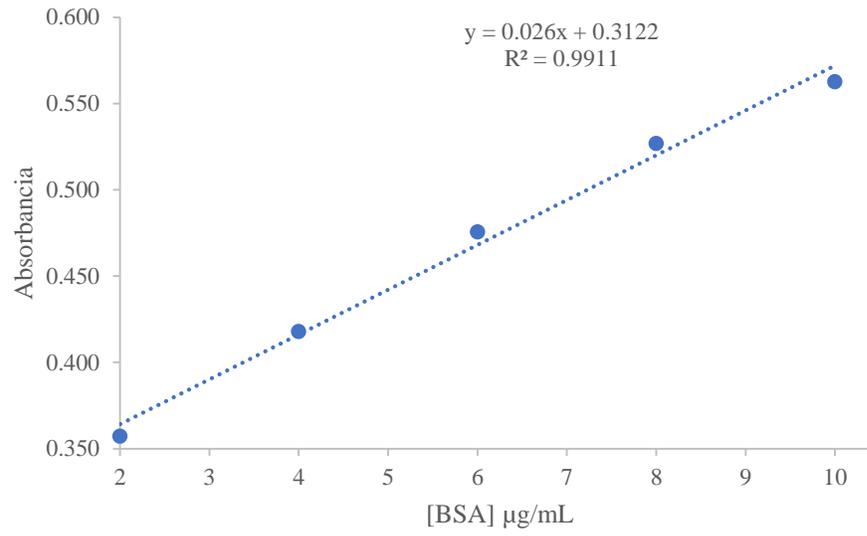
Donde:

Abs b1: Absorbacia a 450 nm de la solución blanco 1.

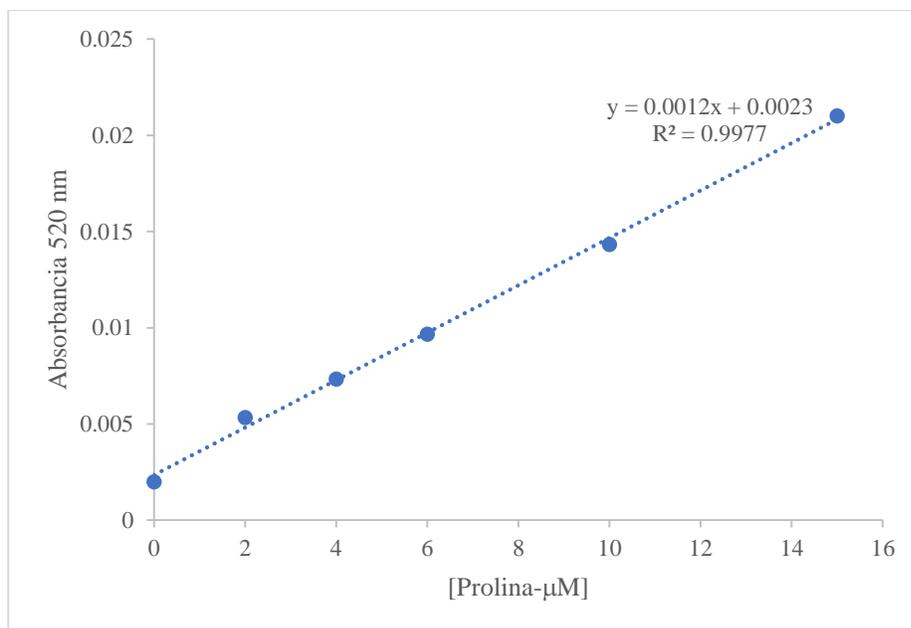
Abs b2: Absorbacia a 450 nm de la solución blanco 2.

Abs b3: Absorbacia a 450 nm de la solución blanco 3.

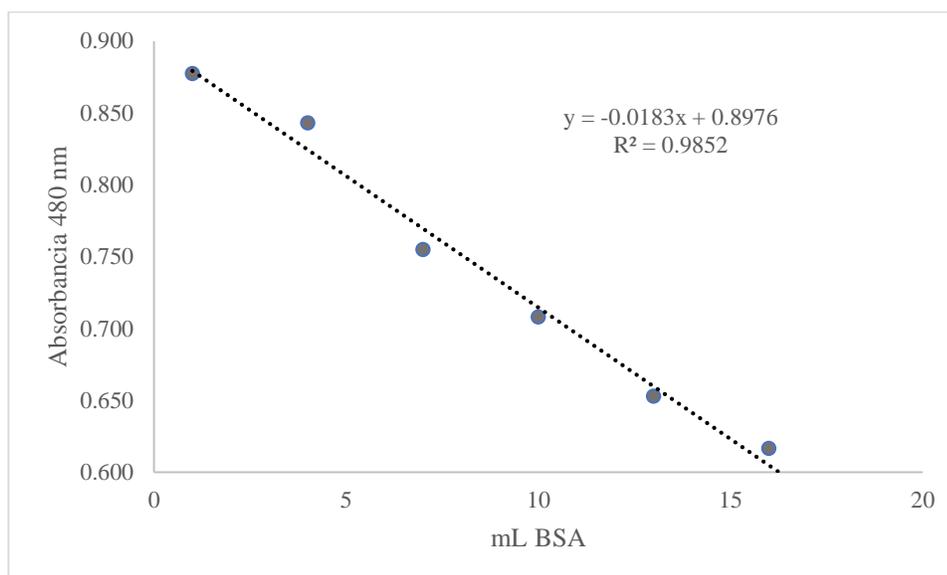
Abs muestra: Absorbacia a 450 nm de la solución con extracto vegetal.



A.4. Curva estándar para el contenido de proteína por el método Bradford.



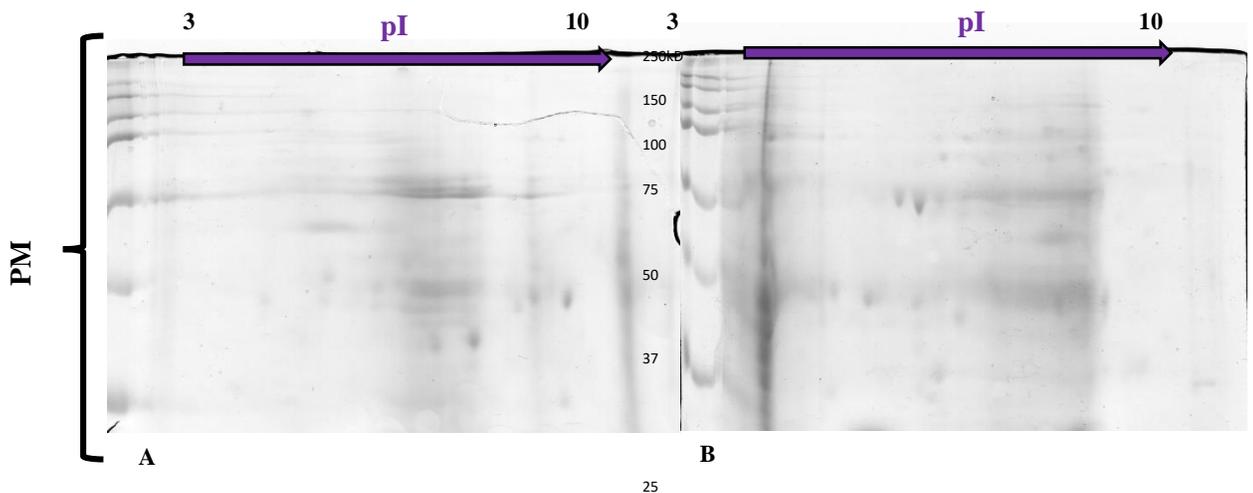
A.5. Curva estándar de cuantificación de prolina.



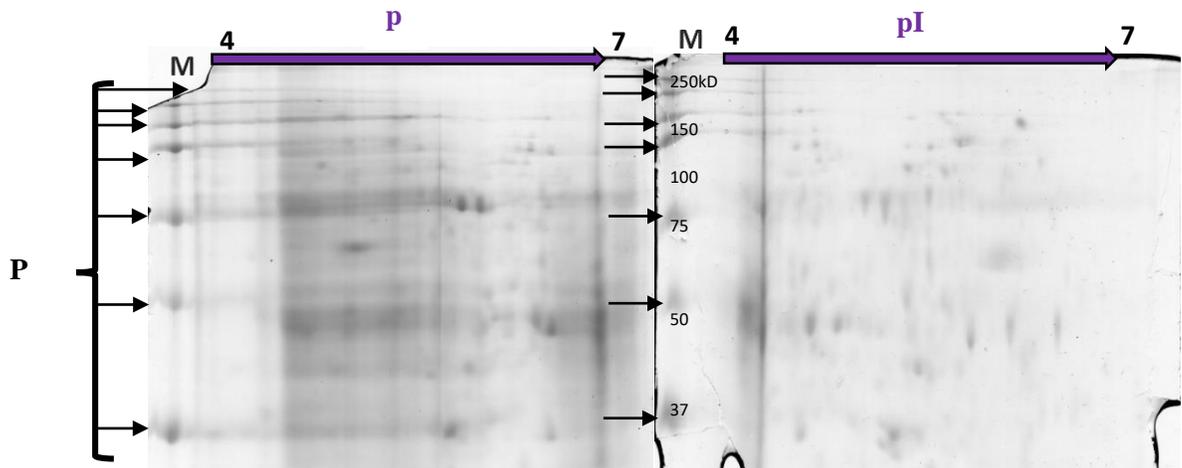
A.6.: Estandarización 2D-Quant Kit.



Figura A.7. Sarcófago para tiras IPG: Depósito de rehidratación para las tiras IPG (Isoelectroenfoque). Se coloca una tira en cada carril.



A.8. Comparación entre perfiles proteómicos obtenidos a partir de raíces. A) tratadas con 1000 mg de grafeno L^{-1} ; B) de raíces del tratamiento control (derecho). **M**: marcador; **pI**: punto isoelectrico (3-10); **PM**: peso molecular.



A.9. Comparación entre perfiles proteómicos obtenidos a partir de raíces. A) tratadas con 1000 mg de grafeno L⁻¹; B) de raíces del tratamiento control (derecho). **M**: marcador; **pI**: punto isoeléctrico (4-7); **PM**: peso molecular.