

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Aplicación de Nanopartículas de Cobre y su Efecto en el Contenido de Antioxidantes en Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Por:

**YOSELIN ATHALIA RIVERA JARAMILLO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Aplicación de Nanopartículas de Cobre y su Efecto en el Contenido de  
Antioxidantes en Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Por:

**YOSELIN ATHALIA RIVERA JARAMILLO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Antonio Juárez Maldonado  
Asesor Principal

Dra. Susana González Morales  
Coasesor

Dra. Silvia Yudith Martínez Amador  
Coasesor

Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía  
Coordinación  
División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2017

## DEDICATORIAS

A mi familia:

### **A mis padres**

A mi padre el **Sr. José Antonio Rivera Rodríguez** por acompañarme en esta aventura, y nunca alejarse de mi a pesar de ser tan terca, por darme la comprensión que necesite en esta recta final y recordarme que nada ni nadie puede detenerme. Por enseñarme el valor de la responsabilidad, a hacer todo con alegría y amabilidad. Por ser mi motivación para superarme en la vida te amo papi.

A mi madre la **Sra. Mónica Jaramillo Ríos** por siempre apoyarme y a pesar de mis decisiones nunca dejar de aconsejarme, por brindarme ese abrazo que me calmaba cuando sentía que no podía más y sobre todo por levantarme cuando sentía que todo estaba perdido te adoro mamita.

### **A mis hermanas**

**Eva** por ser mi mejor amiga escucharme cuando más necesite y tratar de aconsejarme. Por ser tan intuitiva cuando estaba triste y darme una palabra de aliento para alegrarme. Por todas esas risas y momentos llenos de simpatía te quiero.

**Mónica** por ser como una segunda madre para mí, tratar de educarme a pesar de tu corta edad, por la paciencia, cariño y comprensión.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres el **Sr. José Antonio Rivera Rodríguez** y la **Sra. Mónica Jaramillo Ríos** por apoyarme incondicionalmente en mi estudio.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por darme la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida. A mis maestros por el conocimiento que decidieron compartir conmigo, gracias por contribuir a mi superación profesional.

Al **Dr. Antonio Juárez Maldonado** por permitirme trabajar con él, por el tiempo dedicado y apoyo en la realización de esta tesis. Por compartir conmigo un poco de lo mucho que sabe y por sus consejos.

A la **Dra. Susana González Morales** por su contribución para el enriquecimiento de este trabajo.

Al **M.C. Hipólito Hernández Hernández** por su paciencia durante el trabajo en campo, por sus consejos. Por compartir conmigo de su conocimiento y por su amistad.

A todos mis compañeros de carrera generación 2012-2017 que entre risas, discusiones y desacuerdos compartimos una vida. Por sus consejos y su amistad Lupita MG y Rodrigo por hacer un poco más ligero mi camino hacia esta meta. No me queda más que desearles mucho éxito en todos los proyectos que inicien.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	3
Objetivo general .....	3
Objetivos específicos: .....	3
<b>HIPÓTESIS</b> .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
Nanotecnología .....	4
Nanopartículas de elementos minerales .....	5
La seguridad y la salud en la exposición a nanopartículas .....	6
Aplicaciones de las nanopartículas .....	7
Aplicación de las nanopartículas en plantas.....	8
Nanopartículas de cobre .....	9
Aplicación de nanopartículas de cobre en plantas .....	10
Enzimas y compuestos en respuesta al estrés oxidativo .....	13
Calidad nutricional de compuestos antioxidantes.....	17
El licopeno contra el cáncer .....	18
<b>METODOLOGÍA</b> .....	20
Ubicación del experimento .....	20
Variables evaluadas .....	22
Diseño estadístico .....	28
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	29
Efecto de la aplicación de nanopartículas sobre variables agronómicas.....	29
Efecto de la aplicación de nanopartículas sobre calidad de fruto .....	30
Efecto de la aplicación de nanopartículas sobre pigmentos de la hoja .....	31
Efecto de la aplicación de NPs de Cu sobre la actividad enzimática en fruto de tomate.....	32

Efecto de la aplicación de NPs de Cu sobre la actividad antioxidante en hoja de tomate.....	33
<b>CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Análisis de varianza y comparación de medias realizadas a las variables agronómicas relacionadas al desarrollo y crecimiento en plantas de tomate aplicando NPs de Cu y quitosán-PVA.....	30
<b>Tabla 2.</b> Análisis de varianza y comparación de medias realizadas a las variables de calidad de fruto relacionadas al crecimiento y calidad nutricional en plantas de tomate aplicando NPs de Cu y quitosán-PVA.....	31
<b>Tabla 3.</b> Análisis de varianza y comparación de medias realizadas a las variables de pigmentos en hoja de tomate aplicando NPs de Cu y quitosán-PVA.....	32
<b>Tabla 4.</b> Análisis de varianza y comparación de medias realizadas a las variables de compuestos antioxidantes en fruto relacionadas a la actividad antioxidante, vida de anaquel y calidad nutricional en plantas de tomate aplicando NPs de Cu y quitosán-PVA.....	33
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza y comparación de medias realizadas a las variables de compuestos antioxidantes en hoja relacionadas a la actividad antioxidante y respuesta de defensa en plantas de tomate aplicando NPs de Cu y quitosán-PVA.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Influencia de la aplicación de NPs-Cu en la actividad enzimática clave en el ciclo de Calvin (Pradhan <i>et al.</i> , 2015).....	11
<b>Figura 2.</b> Efecto de NPs-Cu en geles de quitosán sobre el crecimiento de plántulas de tomate. (Vinod <i>et al.</i> , 2015).....	12
<b>Figura 3.</b> Compuestos fenólicos y su relación con reacciones de estrés abiótico en plantas.....	15
<b>Figura 4.</b> Mecanismo propuesto para el papel del licopeno en las enfermedades crónicas.....	18
<b>Figura 5.</b> Establecimiento del experimento, trasplante y colocación del sistema de riego.....	21
<b>Figura 6.</b> Esquema de aplicación de tratamientos.....	22
<b>Figura 7.</b> Extracción de biomoléculas.....	24
<b>Figura 8.</b> Determinación de acidez titulable, obtención de la pulpa de fruto, titulación de la muestra.....	27



## RESUMEN

Se estableció un cultivo de tomate tipo bola bajo condiciones de invernadero, con el objetivo de evaluar si la aplicación de nanopartículas (NPs) de cobre (Cu) en hidrogeles de quitosán modifica la concentración de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en hojas y frutos de plantas de tomate. Se aplicaron al sustrato los siguientes tratamientos: 10 mg planta<sup>-1</sup> de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán (1 g planta<sup>-1</sup>), quitosán-PVA (1 g planta<sup>-1</sup>) y un testigo absoluto. Se evaluaron las siguientes variables: APX, catalasa, GPX, glutatión reducido, PAL, fenoles totales, clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides, licopeno, acidez titulable, vitamina C, altura, PSA, PSR y rendimiento. Para el desarrollo del experimento se usó un diseño completamente al azar con 20 repeticiones por tratamiento. En los resultados se observó que la aplicación de los tratamientos mejoró las variables de calidad del fruto. El tratamiento con NPs de Cu aumento un 44% el contenido de licopeno en relación al testigo, mientras que el tratamiento de quitosán-PVA aumento el contenido de vitamina C en un 32.34 % con respecto al testigo. Para las variables de compuestos antioxidantes la aplicación de NPs de Cu mostro diferencias en el contenido de APX, catalasa, GPX, glutatión reducido, PAL y fenoles totales en hoja de tomate, y en fruto la actividad de catalasa (122%) y contenido de GPX (20.47%) aumentaron con respecto al testigo. En cuanto a la actividad de GPX y glutatión reducido en fruto, el tratamiento de quitosán-PVA presentó un aumento del 25.55% y un 24.66% respectivamente en comparación al testigo. En cuanto al contenido de fenoles totales en hoja el tratamiento quitosán-PVA también superó al testigo por 37.69%. Se demostró que la aplicación de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA tienen efectos positivos en variables relacionadas al vigor, compuestos antioxidantes y características nutraceuticas de interés en las plantas de tomate.

**Palabras clave:** tomate, agricultura, compuestos antioxidantes, NPs de Cu, quitosán-PVA.

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es el cultivo hortícola más importante del mundo, éste se usa tanto en fresco como producto procesado (Gad y Hassan, 2013). En México, el cultivo del tomate representa el 37% del valor total de las exportaciones hortícolas y el 16% de las agropecuarias, convirtiéndolo en el principal productor hortícola de exportación (SIAP-SAGARPA, 2008).

La nanotecnología tiene aplicación en sistemas de alimentación y agricultura sustentable, de ésta manera los nanomateriales ofrecen innovación de productos a la industria de alimentos ya que proporcionan una mejor alternativa y estrategia de protección de los cultivos. Actualmente las nanopartículas (partículas de 1 a 100 nanómetros de tamaño) se están utilizando cada vez más para una variedad de propósitos clínicos y comerciales (Somasundaran *et al.*, 2010).

El uso de la nanotecnología es aún limitada, debido a la falta de datos para la adecuada evaluación de su toxicidad (Narayanan *et al.*, 2013). En comparación con los materiales a granel, las nanopartículas (NPs) pueden ser más tóxicas y/o beneficiosas, ya que tienen la capacidad potencial de pasar la membrana celular de la planta debido a su tamaño (Adhikari *et al.*, 2013).

Recientemente, algunos trabajos de investigación han demostrado que las NPs-Cu se depositan en las células de la raíz y hoja, además, se acumulan en los tejidos de la planta (Shi *et al.*, 2014), incrementan la actividad enzimática de catalasa (CAT) y disminuyen la actividad de la ascorbato peroxidasa (APX) en lechuga (Juárez-Maldonado *et al.*, 2015; Trujillo-Reyes *et al.*, 2014). Las NPs-SiO<sub>2</sub> promueven la actividad enzimática SOD y ácido indolacético (IAA) en algodón y se encuentran presentes en la savia del xilema y raíz y son transportadas desde la raíz hacia los brotes (Le *et al.*, 2014).

En este caso el uso de hidrogeles de quitosán sirve para encapsular las NPs de Cu permitiendo un mayor control de liberación en los suelos y sustratos, con poca restricción en la exploración de las raíces.

Además diversos estudios han demostrado que el quitosán posee propiedades antimicrobianas (El Hadrami *et al.*, 2010), operando también como inductor de resistencia (El Hadrami *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2003) Debido a lo anterior se evaluará el uso de las NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA en tomate para buscar mejores características en la planta y activar los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo.

Los antioxidantes en las plantas generalmente están ligados a la capacidad de tolerar estrés oxidativo, la aplicación de NPs de Cu resulta en una mayor generación de antioxidantes, así la planta tendrá mayor capacidad de tolerar algún tipo de estrés ya sea biótico y/o abiótico. Los compuestos generalmente asociados con la capacidad antioxidante son: la catalasa, peroxidasa y vitamina C (entre otros) (Ríos-de-Molina, 2003).

En México la producción del tomate se ve afectada por los cambios en las condiciones climáticas y patógenos del suelo, el presente trabajo busca un beneficio directo para los productores ya que se podrán disminuir los efectos negativos en el cultivo por condiciones adversas induciendo resistencia contra patógenos a través de la aplicación de NPs de Cu así mismo se inducirá un mayor rendimiento del cultivo (SAGARPA, 2010).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar si la aplicación de nanopartículas de cobre en hidrogeles de quitosán-PVA modifica la concentración de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en hojas y frutos de plantas de tomate.

### **Objetivos específicos:**

1. Evaluar la actividad de las enzimas más representativas de la actividad antioxidante.
2. Analizar el efecto de las NPs-Cu sobre el crecimiento y desarrollo de la planta de tomate.
3. Determinar el contenido de compuestos antioxidantes no enzimáticos.

### **HIPÓTESIS**

La aplicación de nanopartículas de cobre afecta significativamente la actividad enzimática y el contenido de compuestos antioxidantes de las plantas de tomate.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Nanotecnología**

La nanotecnología ha sido definida como toda aquella tecnología que se relaciona con nuevos materiales, sistemas y procesos que operan a una escala de 100 nanómetros (nm) o menos, supone la manipulación de materiales y la creación de estructuras y sistemas a escala de átomos y moléculas, esto es, a nanoescala. Las propiedades y efectos de las partículas y materiales a nanoescala difieren considerablemente de las partículas más grandes con igual composición química. Las nanopartículas pueden tener una mayor reactividad química y ser más bioactivas que las partículas más grandes, por su tamaño, tienen mejor acceso a cualquier cuerpo y tienen probabilidad de entrar en células, tejidos y órganos. Estas propiedades ofrecen nuevas aplicaciones en casi todas las áreas de la industria (Záyago y Foladori, 2010).

La nanotecnología tiene aplicación en sistemas de alimentación y agricultura sustentable, mientras que los nanomateriales ofrecen innovación de productos a la industria de alimentos, en forma de colorantes, saborizantes, aditivos nutricionales e ingredientes antibacterianos para el envasado, así como agroquímicos y fertilizantes más potentes. Por ejemplo, compuestos de nanoarcilla (plásticos a los que se les ha agregado plaquetas de arcilla nanoscópicas) tanto en el envasado de alimentos y bebidas como en plásticos de uso agrícola que permiten la liberación controlada de herbicidas; también se está estudiando su empleo como revestimientos de fertilizantes de liberación controlada. La posibilidad que tienen las nanotecnologías de aplicarse a múltiples sectores permite a las compañías ampliar sus actividades comerciales incursionando en otras industrias y nuevos segmentos de mercado (Lugo-Medina *et al.*, 2010).

Las nanopartículas tienen una mayor superficie, lo cual resulta en una mayor reactividad química, actividad biológica y comportamiento catalítico, en comparación con las partículas más grandes con igual composición química (Garnett and Kallinteri, 2006; Limbach *et al.*, 2007; Nel *et al.*, 2006).

### **Nanopartículas de elementos minerales**

La comprensión de la naturaleza de las interacciones entre la ingeniería de nanomateriales y plantas es crucial para comprender el impacto de la nanotecnología en el medio ambiente y la agricultura centrándose en problemas de toxicidad, el tratamiento de enfermedades en las plantas e ingeniería genética. Hasta la fecha, se ha avanzado poco en el estudio entre las interacciones con nanopartículas en plantas a nivel genética (Quintili, 2012).

El enfoque en el uso de nanopartículas, es descubrir los efectos de estas sobre la expresión génica, los nanotubos de carbono de paredes múltiples inducen cambios previamente desconocidos en la expresión génica en las hojas de tomate y las raíces, en particular, sobre la regulación de los genes relacionados con el estrés, incluyendo las provocadas por agentes patógenos y el canal de agua correspondiente al gen *LeAp2*. Una nanopartícula amplificada por las técnicas fototérmica, fotoacústica de formación de imágenes y por espectroscopia, demostraron la detección de los nanotubos de carbono de paredes múltiples en raíces, hojas y frutos a nivel celular. Por lo tanto, esta plataforma integrada permite el estudio del impacto de las nanopartículas sobre las plantas con mayor sensibilidad y especificidad, en comparación con los ensayos existentes (Khodakovskaya *et al.*, 2011).

## **La seguridad y la salud en la exposición a nanopartículas**

Una de las características de las nanopartículas es que la relación entre el número de átomos superficiales y el tamaño de la partícula es de carácter exponencial. Por esas propiedades es importante conocerlas para entender, predecir y gestionar el riesgo potencial que presentan para las personas (Veiga-Álvarez *et al.*, 2015)

Las nanopartículas tienen propiedades y efectos muy diferentes a la de los mismos materiales en tamaños convencionales, lo que también puede dar lugar a nuevos riesgos para la salud del hombre y de otras especies. En efecto, los mecanismos biológicos normales de defensa parecen no ser capaces de responder adecuadamente a estas partículas que pueden tener características tan diferentes. Además, las nanopartículas pueden propagarse y persistir en el medio ambiente, pudiendo tener un importante impacto medio ambiental (Erro, 2011).

El rápido desarrollo y liberación potencial de nanopartículas de ingeniería han planteado considerables preocupaciones debido a las propiedades únicas de los nanomateriales. Un aspecto importante de la evaluación del riesgo de las nanopartículas es comprender las interacciones con las plantas, un componente básico esencial de todos los ecosistemas. El impacto de las nanopartículas en las plantas varía, dependiendo de la composición, concentración, tamaño y otras propiedades químicas y físicas importantes de las nanopartículas y las especies vegetales (Medina *et al.*, 2015).

Tanto los efectos potenciadores como inhibidores de las nanopartículas sobre el crecimiento de las plantas en diferentes etapas de desarrollo han sido documentados. Las nanopartículas podrían ser absorbidas potencialmente por las raíces de las plantas y transportadas a brotes a través de sistemas vasculares dependiendo de la composición, forma, tamaño y anatomía de la planta. A pesar de los conocimientos adquiridos a través de muchos estudios

previos, todavía quedan muchas preguntas sobre el destino y el comportamiento de las nanopartículas en los sistemas vegetales, como el papel de la superficie o la actividad superficial de las nanopartículas en la fitotoxicidad, la ruta potencial de entrada a los tejidos vasculares vegetales y el papel de las paredes de las células vegetales (Ma *et al.*, 2010).

### **Aplicaciones de las nanopartículas**

El uso de nanopartículas en la industria, la salud y las áreas de higiene personal está aumentando de manera exponencial debido a sus propiedades mecánicas, electrónicas y químicas que estas poseen (Somasundaran *et al.*, 2010), estos avances han pavimentado el camino para posibles aplicaciones en la agricultura y la industria alimenticia, ya que proporcionan una mejor alternativa y estrategias prometedoras de protección a los cultivos, pero a pesar de estas características, el uso de la nanotecnología es aún limitada, debido a la falta de datos para la adecuada evaluación de su toxicidad (Narayanan *et al.*, 2013).

Las nanopartículas son gran relevancia en la investigación científica, debido a que tienen una amplia variedad de aplicaciones potenciales en los campos biomédico, biológico, óptico y electrónico, entre otros. El uso principal de las NPs en la industria alimentaria se debe a su actividad antimicrobiana, por ejemplo el dióxido de titanio, es un colorante alimentario que puede utilizarse como barrera de protección en el envasado de alimentos o las NPs de plata utilizadas como agentes antimicrobianos en los paneles de los refrigeradores y frigoríficos, así como en los recipientes de almacenamiento, líneas de envasado y otras superficies destinadas a entrar en contacto con los alimentos. Las NPs orgánicas se emplean principalmente para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, utilizándose como vehículo para la liberación de vitaminas y otros nutrientes incorporados en nanocápsulas (Karunaratne, 2007).



## **Aplicación de las nanopartículas en plantas**

El papel inmunomodulador de los biopolímeros naturales, quitosán, ya ha sido demostrado en plantas, mientras que otros sólo han examinado el efecto de las nanopartículas para aplicaciones biomédicas. Se ha investigado la posible capacidad y mecanismo de las nanopartículas de quitosán para inducir y aumentar inmunorespuestas en plantas. En quitosán ha sido ampliamente utilizado para aplicaciones basadas en materiales y cosméticos. Sin embargo, en los últimos tiempos la biomedicina y agricultura también han presenciado un creciente interés en el quitosán como agente terapéutico (Chandra *et al.*, 2015).

Las nanopartículas de minerales han sido utilizadas en distintos estudios para analizar los procesos de estrés oxidativo y como estos modifican la expresión génica en las plantas, además de tener un efecto en los patógenos del suelo y ser usadas como insecticidas (Peralta y Volke, 2012).

Con respecto a la eficacia del quitosán en la inducción de la defensa en la planta, en hojas de *Camellia sinensis* aumento la capacidad de la enzima peroxidasa (Chandra *et al.*, 2015).

La liberación de nanopartículas de plata (NPs-Ag) en el medio ambiente ha planteado preocupaciones sobre sus efectos en organismos vivos, incluyendo plantas. Se estudió, los cambios en expresión de genes en *Arabidopsis thaliana* expuesta a polivinilpirrolidona- NPs-Ag, el estrés inducido por NPs-Ag origina en la planta toxicidad, mientras que en los genes asociados a la respuesta contra patógenos presentaron un solapamiento al ser expresados (Kaveh *et al.*, 2013).

En un ensayo sobre el efecto de la aplicación de NPs-ZnO en plántulas de soja verde y garbanzo las curvas de respuesta a la aplicación de NPs-ZnO sobre raíces, brotes de *Vigna radiata* (Soja verde) y plántulas de garbanzo dio como resultado en las raíces y retoños un incremento en el crecimiento con el aumento en la concentración de NPs-ZnO. A una concentración de 2000 ppm hubo un retraso en el crecimiento de la raíz y brotes, reducción de la raíz. En las dosis más altas la reducción de crecimiento puede atribuirse al nivel tóxico

de las nanopartículas. Esto demuestra que las plántulas de soja verde y garbanzo responden a la aplicación de nanopartículas en un rango limitado, si ese límite es sobrepasado se produce una disminución en el crecimiento debido al efecto tóxico (Pramod *et al.*, 2011).

### **Nanopartículas de cobre**

Las nanopartículas de cobre (NPs de Cu) han atraído mucho la atención en los últimos años por ser un metal semiconductor, por sus propiedades físicas, químicas, antimicrobianas, así como por su abundancia (Betancourt-Galindo *et al.*, 2013). Además, el cobre posee un importante papel biológico en el proceso de fotosíntesis de las plantas, aunque no forma parte de la composición de la clorofila.

El cobre contribuye a la formación de glóbulos rojos y al mantenimiento de los vasos sanguíneos, nervios, sistema inmunitario y huesos. Por tanto, es un oligoelemento esencial para la vida humana y tiene un gran potencial para emplearse en desarrollos tecnológicos sustentables, las NPs de Cu ya han demostrado su acción antibacterial en patógenos humanos y enfermedades nosocomiales (Baba, 2006).

El cobre ha sido de interés particular porque a diferencia de otros metales antimicrobiales, presenta un amplio espectro de acción contra bacterias y hongos. La eficacia del cobre depende de las condiciones del medio ambiente, la concentración de iones de cobre y el tipo de microorganismos. Dada la efectividad del cobre contra organismos patógenos asociados con enfermedades de plantas y animales, ha sido utilizado ampliamente en el sector agropecuario como pesticida desde hace miles de años y últimamente como promotor de crecimiento vegetal (Jaiswal *et al.*, 2012).

## **Aplicación de nanopartículas de cobre en plantas**

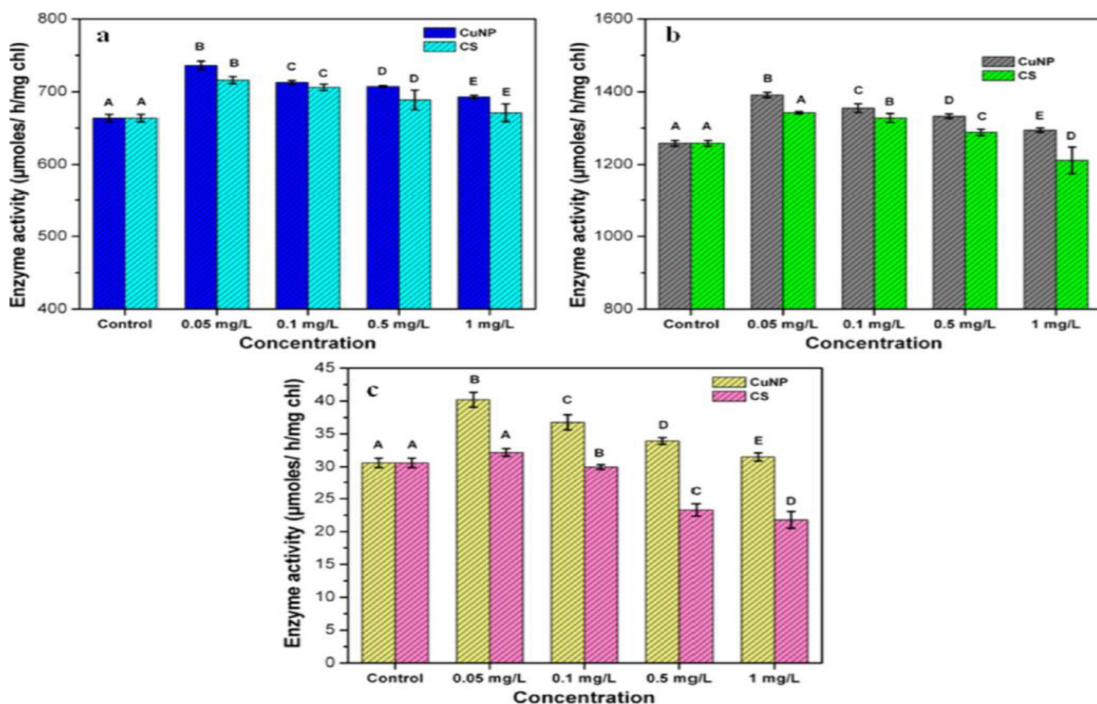
Principalmente la agricultura ha sido testigo de cambios radicales desde el siglo pasado con un giro basado en la investigación, desarrollando su industrialización con monocultivos a gran escala, la mecanización, la irrigación, el uso de fertilizantes artificiales, etc. (Ingeborg y Kare, 2014).

Los avances nanotecnológicos presentados en el sector agrícola se basan en fertilizantes nanoestructurados que pueden aumentar la eficiencia en el uso de nutrientes a través de mecanismos como la ejecución selectiva, lenta o de liberación controlada, liberando sus ingredientes activos en respuesta a su ambiente y demanda biológica. En recientes investigaciones a escala de laboratorio, se ha informado que los nano-fertilizantes pueden mejorar la productividad de los cultivos mediante la mejora de la tasa de germinación de semillas, crecimiento de las plántulas, actividad fotosintética, el metabolismo del nitrógeno, y de carbohidratos y la síntesis de proteína (Solanki *et al.*, 2015). Las principales ventajas de estos sistemas agrícolas son la liberación gradual, sostenida y controlada durante un largo período de tiempo, con el objetivo de mejorar la protección del cultivo (Aouada y Moura, 2015).

En algunas plantas el efecto del cobre es tóxico, se hizo una evaluación en *Vigna mungo* donde la actividad microbiológica del suelo no se vio afectada en todos los tratamientos de nanopartículas, una variable analizada fue la germinación en donde las nanopartículas de cobre revelaron 76.0 y 81.0% de germinación de la semilla. Como al igual que en el control, todos los parámetros de crecimiento se incrementaron en intervalos de tiempo periódicos en el tratamiento de quitosán al igual que en el tratamiento de nanopartículas. En su capacidad de insecticida el tratamiento con NPs de Cu, demostró el máximo efecto sobre hongos. La población bacteriana se redujo en el tratamiento de nanopartículas de plata (Selvaraj–Karthick, 2015).

La deficiencia de cobre o su toxicidad en suelos agrícolas afecta en la fisiología y el crecimiento de una planta, dificultando reacciones fotoquímicas y

bioquímicas dentro del sistema. El sulfato de cobre ha sido ampliamente utilizado a pesar de sus efectos tóxicos, una alternativa para evitar estos problemas es la síntesis de NPs de Cu, estas fueron evaluadas en *Vigna radiata*, se observó que en las plantas tratadas con NPs de Cu hubo una mayor actividad fotosintética, se demostró una mejor asimilación del nitrógeno en comparación al tratamiento que solo tenía sulfato de cobre. Las nanopartículas influyeron en la actividad de tres enzimas claves en el ciclo de Calvin, la fructosa-1, 6-bifosfato fosfatasa (FBPasa), ribulosa-5-fosfato quinasa (RBPasa) y NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPDHasa) (Fig. 1) este resultado indica que NPs de Cu podrían desempeñar un papel fundamental en la reacción oscura de la fotosíntesis (Pradhan *et al.*, 2015).

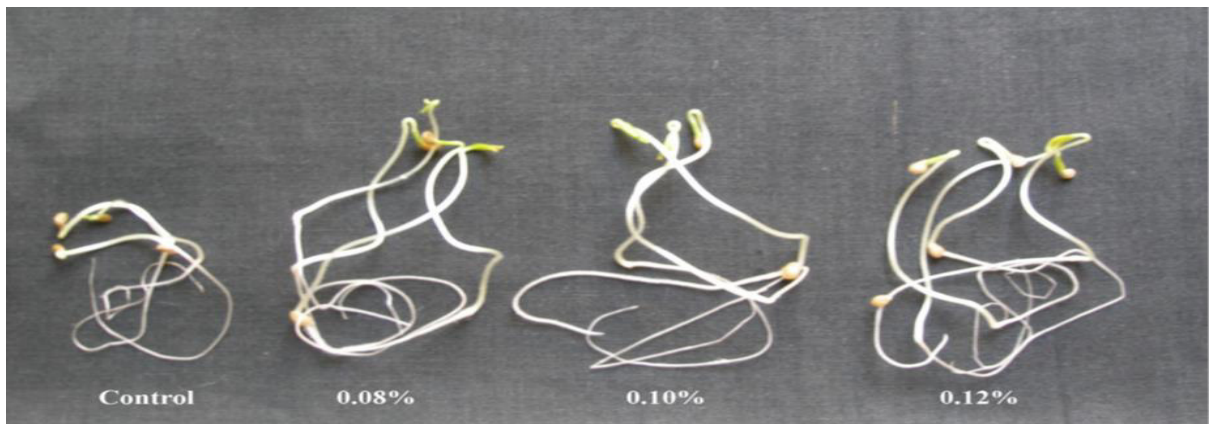


**Figura 1.** Influencia de la aplicación de NPs-Cu en la actividad enzimática clave en el ciclo de Calvin (Pradhan *et al.*, 2015).

La respuesta al estrés en el tratamiento con NPs de Cu fue mínima. En el caso de la peroxidasa (POD) que participa en procesos de desarrollo, biosíntesis del etileno y defensa en la planta. Sus niveles (POD) estaban casi sin cambios entre control y los tratados con NPs de Cu, mientras que el tratamiento con sulfato de cobre (CS) mostró cambios drásticos con respecto al control. Por lo

tanto, los tejidos de la planta tratada con NPs de Cu (raíz y hojas) no eran alterados, manteniendo la homeostasis normal en el sistema metabólico. La prolina es un marcador de estrés conocido, que contrarresta el efecto perjudicial de la tensión para mantener el equilibrio de los mecanismos celulares. Por lo tanto, las actividades con elevadas concentraciones de prolina en tratamientos con NPs de Cu ayudaron a superar el posible efecto perjudicial de las plantas forzado por la acción de las nanopartículas (Pradhan *et al.*, 2015).

NPs de Cu fueron sintetizadas para evaluar la acción antifúngica en tomate (*Solanum lycopersicum* Mill). El tratamiento con NPs de Cu demostró un efecto importante en el desarrollo del tomate, tanto en la germinación, como el desarrollo de las plántulas, peso seco y peso fresco. Las concentraciones de 61.5 y 83.0% causaron inhibición en la germinación de las esporas de *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente, en un modelo *in vitro* entre los tratamientos, el crecimiento micelial *in vitro* y la germinación de las esporas de *A. solani* y el *F. oxysporum* se inhibió eficazmente en las concentraciones de 0.10 y 0.12% de NPs de Cu. La síntesis de NPs de Cu en geles de quitosán abre la posibilidad para su uso contra hongos y enfermedades a nivel de campo abierto (Saharan *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Efecto de NPs-Cu en geles de quitosán sobre el crecimiento de plántulas de tomate (Saharan *et al.*, 2015).

En *Elodea densa* Planch los iones de cobre y nanopartículas incrementan la activan de peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, en las plantas tratadas con nanopartículas de cobre aumentan por un factor de 1.5 a 2.0. Cuando la

concentración de nanopartículas se aumentó desde 0.025 hasta 0.5 mg/l, la actividad de la catalasa aumento en casi 1.5 veces más, en comparación con el control ( $U = 0.049$ ,  $p = 0.05$ ) (Nekrasova *et al.*, 2011).

En un estudio en garbanzo y soya el crecimiento de las raíces era impedido por la concentración de 500 ppm de Cu. Con el aumento de concentración de NPs de Cu, la elongación de las raíces se inhibió gravemente en comparación a la del control. En muchos casos se produjo necrosis radical. La adsorción masiva de NPs de Cu en el sistema de la raíz era responsable de la toxicidad (Adhikari *et al.*, 2013).

### **Enzimas y compuestos en respuesta al estrés oxidativo**

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos (Gutteridge y Halliwell, 1999).

Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos, y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singlete (Gordon, 2001).

Perez Gastell y Pérez de Alejo (2000), señalaron que uno de los mecanismos de acción de los antioxidantes presentes en el cuerpo es aquél en que la molécula de antioxidante, al colisionar con un radical libre de oxígeno, le cede

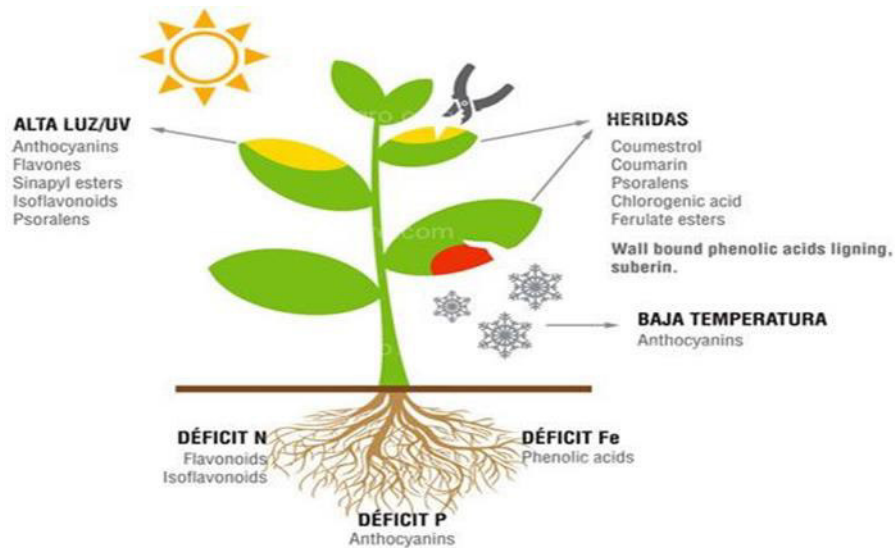
un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un radical libre de oxígeno débil no tóxico.

La Vitamina C ayuda a proteger las plantas contra el estrés hídrico o el estrés causado por el ozono y la radiación UV. Se usa en el proceso fotosintético; puede regular el crecimiento celular (Smirnoff y Weelet, 2000) y sirve como un regulador de reacciones redox. Sin embargo, el exceso de vitamina C puede tener un efecto negativo en el crecimiento de las plantas (Quian *et al.*, 2014).

La vitamina C desempeña un papel fundamental en la fotoprotección y la regulación de la fotosíntesis, y preserva las actividades de enzimas que tienen iones metálicos de transición ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) como grupo prostético. El ascorbato es también un poderoso antioxidante secundario, ya que reduce la forma oxidada del  $\alpha$ -tocoferol. Adicionalmente, es el reductor utilizado para la hidroxilación de residuos de prolina de la extensina, una proteína de la pared celular. También está implicado en la elongación de la raíz, el funcionamiento de los estomas, y desempeña una función crítica asociada a los mecanismos a través de los cuales las plantas reconocen los cambios medioambientales y responden a ellos (Foyer y Noctor, 2005).

Los compuestos fenólicos y polifenólicos, entre los que se destacan los bioflavonoides, son considerados antioxidantes no nutrientes. Tienen como estructura fundamental la flavona. Estos reducen la fragilidad y/o permeabilidad capilar, manteniendo la integridad vascular. Además pueden quelar iones metálicos evitando que estos actúen como catalizadores en las reacciones de formación de radicales libres (Shindo *et al.*, 1994).

El fenol es muy utilizado en la industria química, farmacéutica y clínica como un potente fungicida, bactericida, sanitizante, antiséptico y desinfectante, también para producir agroquímicos, bisfenol A (materia prima para producir resinas epoxi y policarbonatos) (Ávalos y Pérez, 2009). En la figura 3 se presentan algunos compuestos fenólicos y su relación con reacciones de estrés abiótico en plantas.



**Figura 3.** Reacciones de estrés abiótico en plantas (Ávalos y Pérez, 2009).

La enzima superóxido dismutasa (SOD), antiguamente hemocupreína y eritrocupreína, catalizan la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Son las principales antioxidantes enzimáticas presentes en células procarióticas y eucarióticas, y son las primeras en la defensa contra los efectos tóxicos del radical superóxido producido en los diferentes compartimentos celulares (Halliwell y Gutteridge, 2000).

La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso. El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos y tiene entre otras una función protectora contra microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos. Esta función la efectúa esta enzima que cataliza su descomposición en agua y oxígeno (Chance *et al.*, 1997). La catalasa previene la difusión de  $H_2O_2$  a otros compartimentos celulares. Son numerosos los estudios que han puesto de



manifiesto que la catalasa es una enzima esencial en el mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés (Scandalios, 2005).

Ha sido ampliamente descrito que la expresión de ascorbato peroxidasa (APX) se incrementa bajo condiciones de sobreproducción de  $H_2O_2$ , como las inducidas por estrés biótico o abiótico, lo que puede indicar que variaciones en la producción de  $H_2O_2$  también regulan la APX (Dat *et al.*, 2000). Asimismo, se ha descrito un papel regulador para el ascorbato en la actividad APX durante la diferenciación celular, y bajo condiciones experimentales de déficit o enriquecimiento de ascorbato (De Gara *et al.*, 1997). Además, el control de la expresión de los genes que codifican las APXs es sensible a diversos estímulos como el estrés provocado por agua, salinidad, altas temperaturas, congelación, ataque por patógenos, tratamiento con peróxido de hidrógeno y ácido abscísico (Zhang *et al.*, 1997).

La síntesis de licopeno es severamente inhibida por la exposición a la radiación solar intensa y se ha sugerido que el daño por radiación al tomate puede deberse a los efectos generales del sobrecalentamiento de los tejidos irradiados (Dumas *et al.*, 2003). Por lo que cabe esperar que los tomates en esta zona cultivados a campo tengan concentraciones menores de este carotenoide.

En el tomate, el  $\beta$ -caroteno y el licopeno se encuentran en forma de estructuras semicristalinas unidas a la membrana de los cromoplastos o cloroplastos (Southon y Faulks, 2001).

Estudios realizados en humanos muestran que el consumo de tomate y productos a base de esta hortaliza, por un tiempo determinado, puede aumentar la protección del ADN ante el daño inducido por ROS. Este efecto que puede explicarse por la sinergia de los diferentes antioxidantes presentes en el tomate. Originalmente la actividad antioxidante del tomate se asoció principalmente a su contenido de licopeno. Sin embargo, el tomate es fuente de ácido ascórbico, polifenoles y flavonoides que también tienen esta actividad, y que probablemente contribuyen a los efectos observados (Palomo *et al.*, 2010).

## **Calidad nutricional de compuestos antioxidantes**

El ser humano está protegido del estrés oxidativo gracias a la acción de estas sustancias antioxidantes que poseen diferentes funciones (Shi *et al.*, 2001). Los radicales superóxido se forman por la adición de un electrón al oxígeno molecular. Estas especies altamente reactivas pueden entonces adquirir otro electrón y combinarse con protones para formar peróxido de hidrógeno. En presencia de metales de transición, tales como el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$ , el peróxido de hidrógeno se rompe para formar especies de oxígeno aún más reactivas con capacidad de dañar el DNA de forma directa o participar en las reacciones de propagación en cadena de los lípidos de membrana (Venereo, 2002).

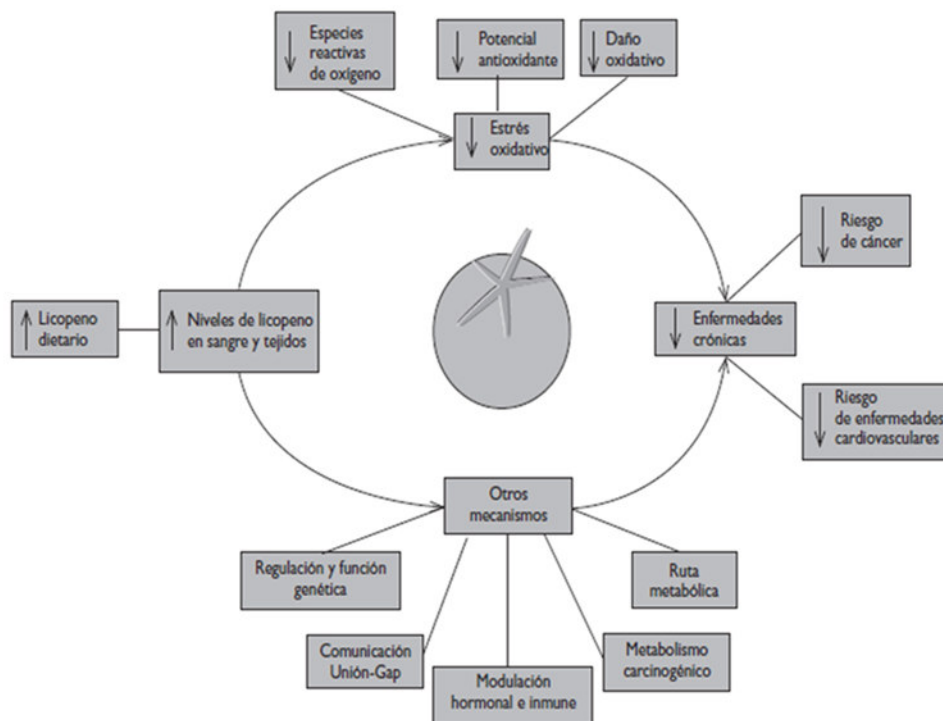
Las células de los animales y las plantas se autoprotegen contra estos efectos desplegando las así llamadas sustancias antioxidantes para atrapar o amortiguar los radicales libres y, por lo tanto, detener las reacciones dañinas provocadas por ellos. En los puntos más vulnerables al daño oxidativo, las células despliegan en el ambiente intra y extracelular una gran variedad de sistemas de defensa basados en antioxidantes, solubles en agua o en lípidos, y en enzimas antioxidantes. Muchos de estos sistemas defensivos del cuerpo humano son dependientes de los antioxidantes que se derivan de la dieta. La teoría que se basa en que los radicales libres son la principal causa del cáncer en la especie humana, y en que el riesgo de enfermedades se reduce con un aumento en el consumo de antioxidantes transportados por los alimentos ha provocado un enorme interés por los antioxidantes nutricionales y otras sustancias antioxidantes presentes en los alimentos (Jonson *et al.*, 2001).

La vitamina C está presente en las frutas, verduras y patatas en forma de ácido L-ascórbico y ácido dehidroascórbico. El ascorbato es, probablemente, el antioxidante hidrosoluble más efectivo presente en el plasma. Es capaz de atrapar y reducir nitritos, inhibiendo por tanto la formación en el estómago de compuestos carcinogénicos (N-nitroso). Los estudios *in vitro* sugieren que

ejerce un papel protector contra el daño oxidativo de los constituyentes celulares y las lipoproteínas circulantes (Zapata *et al.*, 2007).

### El licopeno contra el cáncer

El licopeno es el carotenoide más abundante en el tomate, pues comprende aproximadamente de 80 a 90% de los pigmentos presentes (Shi, 2000). La cantidad de licopeno en tomates frescos puede variar dependiendo de la especie, la madurez y las condiciones ambientales en las que la fruta madura. Normalmente, los tomates contienen cerca de 3 a 5 mg de licopeno por 100 g de material crudo (Hard y Scott, 1995).



**Figura 4.** Mecanismo propuesto para el papel del licopeno en las enfermedades crónicas.

En México el cáncer ocupa el tercer lugar de las causas de muerte con 18%; el más común en hombres es el de próstata, seguido del de intestino, estómago y colorrectal; el de cérvix es el más común en mujeres, seguido por el de seno,

estómago y ovario. Se ha publicado un gran número de datos epidemiológicos sobre la relación entre el riesgo de padecer cáncer y la ingesta dietaria de licopeno de tomate y productos de tomate. Con evidencia epidemiológica del posible efecto protector del licopeno contra el cáncer, diversos estudios de cultivos de células y tejidos animales han demostrado el potencial anticancerígeno del licopeno. En un estudio de cultivo celular se investigaron las propiedades de antiproliferación del licopeno en comparación con  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, empleando células cancerosas de endometrio, glándula mamaria y de pulmón (Waliszewski y Blasco, 2010).

En un trabajo se estudió el efecto de la ingesta crónica de licopeno sobre el crecimiento y desarrollo de tumores mamarios en ratones vírgenes SHN (ratones genéticamente susceptibles al desarrollo de tumores de mama). Los autores encontraron que los ratones alimentados con licopeno tuvieron un ataque demorado y reducción espontánea de crecimiento y desarrollo de tumores mamarios. Esta supresión se asoció con la reducida actividad de la timidilato sintetasa de la glándula mamaria, una enzima esencial requerida para la síntesis de ADN, disminución de los ácidos grasos libres séricos y prolactina, hormona conocida por estar involucrada en el desarrollo de cáncer de pecho (Levy *et al.*, 1995).

## **METODOLOGÍA**

### **Ubicación del experimento**

El presente estudio se realizó en un invernadero tipo multitunel, orientación Sur-Norte, con cubierta de polietileno ubicado en el Departamento Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Saltillo, México (coordenadas 25°21'21.50 latitud Norte y 101° 2'10.82 longitud Oeste, a un altitud de 1763 msnm).

### **Desarrollo experimental**

Se germinaron semillas de tomate bola híbrido variedad “huno F1” de crecimiento indeterminado en charolas de poliestireno. Las plántulas se desarrollaron durante 30 días. El trasplante se realizó en macetas de 12 L con una mezcla de peat moss y perlita 50:50 (v/v). Se usó como medio de nutrición solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961) mediante un sistema de riego dirigido para proveer los nutrientes necesarios para el crecimiento. Los microelementos de la solución nutritiva se aplicaron en forma de quelatos. El aporte de los nutrientes fue ajustado manejando la concentración de la solución Steiner de acuerdo con la etapa fenológica del cultivo: 25% durante dos semanas a partir del trasplante, 50% las semanas 3 y 4, 75% las semanas 5 y 6, y 100% a partir de la semana 7 (Figura 5).

Durante el desarrollo del cultivo se realizaron las labores culturales correspondientes como la poda, tutoreo, anillado, etc. Finalmente, cuando las plantas alcanzaron una altura promedio a los 175 ddt, se eliminó el ápice central para evitar su crecimiento y esperar la maduración de los frutos amarrados.



**Figura 5.** Establecimiento del experimento, trasplante y colocación del sistema de riego.

### **Síntesis de nanopartículas de Cu (NPs-Cu)**

La síntesis de hidrogeles de quitosán-PVA se realizó en una planta piloto del Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA), primeramente se disolvieron 250 mL de quitosán al 2% y 250 mL de acetato de polivinilo (PVA) al 4% (300 rpm,  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $t = 2\text{ h}$ ), posteriormente se agregaron 2.27 mL de glutaraldehído al 50% (450 rpm,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $t = 5\text{ min}$ ), después se le agregó 100 mL de NaOH al 6% (300 rpm,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $t = 1\text{ h}$ ), posteriormente se realizó el lavado y purificación con agua destilada y etanol, por último se secaron y se pesaron.

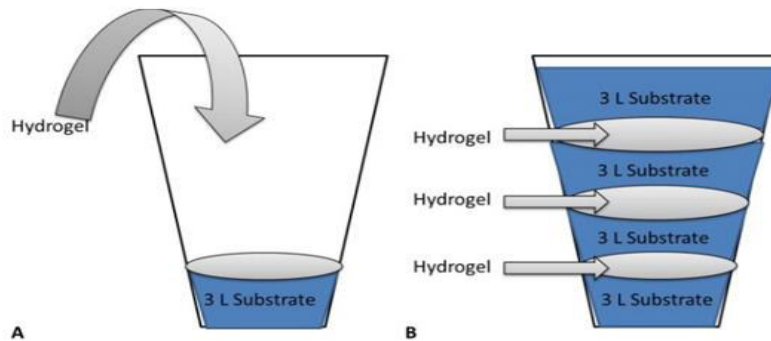
Después de haber obtenido los hidrogeles de quitosán-PVA, se agregaron las nanopartículas de cobre, las cuales fueron adquiridas en Sky Spring nanomaterials Inc. USA (morfología esférica, pureza del 99.8% y diámetro promedio de 25 nm). Primero se preparó una solución de Tween al 1% y se agregaron las NPs Cu, después se dispersaron por vibración ultrasónica durante 20 min (potencia de 50 watts y frecuencia del 70%), finalmente las NPs

Cu se absorbieron en los hidrogeles de quitosán-PVA y se secaron a una temperatura de 60 °C. La concentración de NPs Cu absorbida en 1 gramo de hidrogel de quitosán-PVA fue de 10 mg.

## Tratamientos

La aplicación de los tratamientos fue al sustrato, las NPs-Cu en hidrogeles de quitosán-PVA se aplicaron previamente al trasplante de las plantas de tomate, distribuyendo 1 g de hidrogeles en tres niveles de la maceta (Figura 6). Los tratamientos que se aplicaron fueron:

- 1) 10 mg planta<sup>-1</sup> de NPs de Cu en 1 g de hidrogel de quitosán-PVA
- 2) Quitosán-PVA (1g planta<sup>-1</sup>)
- 3) Testigo absoluto.



**Figura 6.** Esquema de aplicación de tratamientos

## Variables evaluadas

Las variables agronómicas evaluadas en las plantas de tomate fueron la altura de la planta, a los 75 ddt se midió con una cinta métrica y se contabilizaron, número de racimos, número de frutos amarrados y rendimiento.

El rendimiento se evaluó en la cosecha obteniendo en número de frutos por plantas y el peso promedio de frutos (g/planta), se pesó cada fruto por planta en una balanza analítica marca PIONEER modelo PA1502, esto se realizó cada 15 días o cuando los frutos estuvieran maduros.

A los 175 ddt las plantas fueron colectadas, pesadas en fresco y secadas en una estufa deshidratadora a 80°C durante 72 h para determinar la biomasa seca de la parte aérea (hojas y tallos) y de raíz.

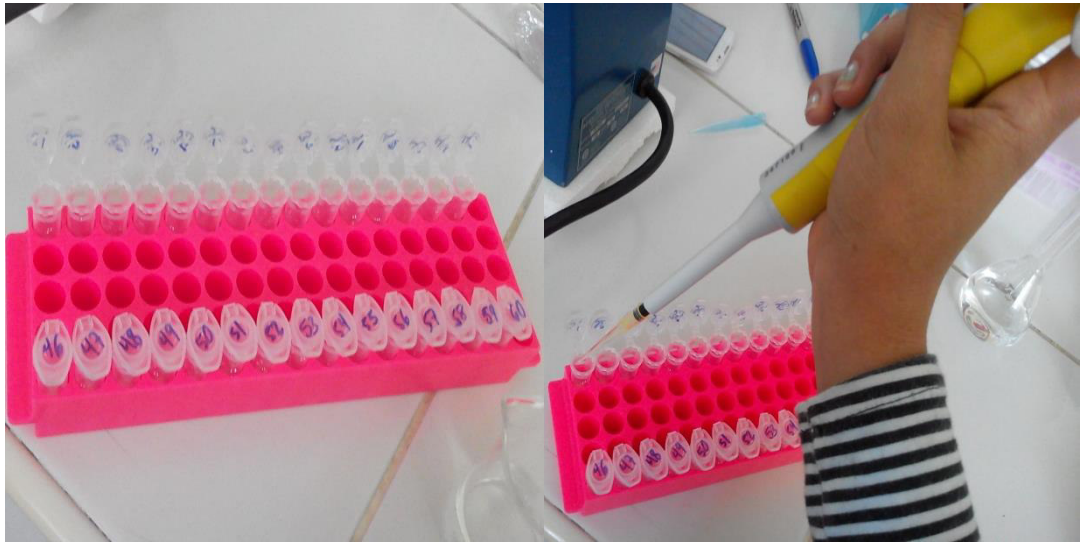
Determinación de contenido de clorofila y carotenoides. Las hojas de tomate de cada tratamiento se criogenizaron con nitrógeno líquido, después se tomó 0.1 g y se adicionó 1 mL de acetona al 100%, enseguida se centrifugó a 3024 g por 5 min. Se tomó 0.05 mL del sobrenadante y se le agregó 0.95 mL de acetona al 80% (buffer de fosfato de sodio 2.5 mM pH 7.8), como blanco se utilizó acetona al 80%, posteriormente se estimó los contenidos de clorofila (Porra, 2002) y carotenoides totales (Wellburn, 1994) espectrofotométricamente y se expresaron en mg g<sup>-1</sup> de peso fresco.

La cuantificación de la actividad enzimática se determinó en tejido fresco de hojas y frutos colectados en la cosecha del primer racimo, se tomaron muestras de frutos que presentaran características similares como tiempo de maduración, tamaño, color, etc. Las muestras se congelaron a -20°C y posteriormente se liofilizaron. Se tomaron 200 mg de tejido liofilizado, se molieron en un mortero y se colocaron en un tubo para microcentrífuga agregando 20 mg de polivinil pirrolidona, 1.5 ml de buffer de fosfatos pH 7-7.2 (0.1 M). El extracto obtenido se centrifugo a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga (Labnet Int. Inc., Modelo Prism™ R), el sobrenadante fue recolectado y filtrado con una membrana de nylon (Ramos *et al.*, 2010), finalmente se preparó una dilución en una proporción 1:20 con buffer de fosfatos para el análisis de acuerdo a las siguientes metodologías (Figura 7).

Catalasa (EC 1.11.1.6). Se midió de acuerdo a Beers y Sizer (1952). Se preparó un blanco para cada muestra: 930 µL de buffer de fosfatos y 70 µL del extracto.



Después se tomaron 70  $\mu\text{L}$  del extracto y se le agregó 920  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos, se añadió 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 M) para iniciar la reacción. Se anotó la absorbancia inicial, después cada 20 segundos durante 3 minutos. La descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue seguido por la disminución de la absorbancia a 270 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se preparó una curva de calibración con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20-100 mM) y los resultados fueron expresados en  $\text{mM de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$  por proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ ).



**Figura 7.** Extracción de biomoléculas

Superóxido dismutasa (EQ 1.15.1.1). A 10  $\mu\text{L}$  del extracto o estándar se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de detector radical (sal de tetrazolio). Para iniciar la reacción se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de xantina oxidasa. Posteriormente se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y después se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas para ELISA (modelo LEX-808 IU). Se preparó una curva de calibración con SOD estándar y los resultados se expresaron como U/mL de SOD.

Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9). Se utilizó el método modificado por Floe and Gunze (1984) usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato. Se tomaron 0.2 mL de extracto enzimático, añadiendo 0.4 mL de glutación reducido (0.1 M) y 0.2 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.067 M), esta mezcla se pre-calento en baño de agua a 25  $^\circ\text{C}$  por 5 minutos, posteriormente se le agregaron 0.2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.3 mM) para iniciar

la reacción catalítica. Se dejó reaccionar por 10 min y se detuvo mediante la adición de 1 mL de ácido tricloro acético al 1%, posteriormente esta mezcla se colocó en baño de hielo por 30 min. Enseguida se centrifugo 3000 rpm por 10 min. Finalmente 0.48 mL del sobrenadante se colocaron en celdilla y se le agregaron 2.2 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.32 M) y 0.32 ml (1 mM) del colorante 5,5 ditio-bis-2 ácido nitro benzoico (DTNB Sigma). Se preparó un blanco: 1.1 mL 0.32 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.16 mL de 1 mM de DTNB y 0.24 mL de buffer de fosfatos. Posteriormente se leyó la mezcla en un espectrofotómetro UV-Vis a 412 nm (Xue *et al.*, 2001). Se realizó una curva de calibración con glutatión reducido estándar (20-100  $\mu\text{mol}$ ) y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de glutatión por  $\text{min}^{-1}$  por proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Ascorbato peroxidasa (EC. 1.11.1.1). La cuantificación de la actividad de la ascorbato peroxidasa se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por Nakano y Asada (1987). Se preparó un blanco: 700  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos, 100  $\mu\text{L}$  de EDTA (1mM), 100  $\mu\text{L}$  de Ascorbato (5 mM) y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM). Posteriormente se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto y se le agregaron 600  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos más 100  $\mu\text{L}$  de EDTA (1mM), 100  $\mu\text{L}$  de Ascorbato (5 mM) y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) para iniciar la reacción. Se anotó la absorbancia inicial y la final después de 1 minuto. La oxidación del ascorbato fue seguido por la disminución de la absorbancia a 266 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se preparó una curva de calibración con ascorbato (10-100  $\mu\text{mol}$ ) y los resultados fueron expresados en  $\mu\text{mol}$  de ascorbato  $\text{min}^{-1}$  por proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Glutatión reducido (GSH). Se realizó colorimétricamente mediante la reacción con DTNB. Se colocó en un tubo eppendorf 0.48 mL del extracto y se le agregó 2.2 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.32 M más 0.32 mL del colorante DTNB 1 mM. Se mezcló perfectamente y se leyó la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro UV-Vis 25, los datos obtenidos fueron interpolada a una curva de calibración previamente estandarizada con GSH y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de GSH por  $\text{mg}^{-1}$  de proteínas totales.

Fenilalanina amonio liasa (EQ 4.3.1.5). Se determinó de acuerdo a Sykłowska-Baranek (2012), con algunas modificaciones. Se tomaron 0.1 mL del extracto enzimático y se agregaron 0.9 mL de L-Fenilalanina (6 mM). Después de 30 min de incubación a 40°C se detuvo la reacción con 0.25 mL de HCl 5 N. Las muestras se colocaron en baño de hielo y se les adicionó 5 mL de agua destilada. La absorbancia se determinó a 290 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se realizó una curva de calibración con ácido transcinámico (300-3000  $\mu\text{mol}$ ) y los resultados se expresaron como la producción de 1  $\mu\text{mol}$  de ácido transcinámico por  $\text{min}^{-1}$  por proteínas totales ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Fenoles totales. Se determinó de acuerdo a la metodología de Singleton y Rossi (1965), con algunas modificaciones. Se pesaron 250 mg de hoja criogenizada con nitrógeno líquido y se agregó 1 mL de metanol al 80%, después se sometió a centrifugar a 10 000 rpm durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y con el pellet se repitió el mismo procedimiento con metanol concentrado. El sobrenadante se ajustó a 2 mL con metanol concentrado y se pusieron en oscuridad. Posteriormente, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto más 1.5 mL de agua destilada, después se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu, enseguida se añadió 200  $\mu\text{L}$   $\text{NaCO}_3$  al 20% y se dejó reposar durante 30 min. La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico (0.02-0.4  $\text{mg/mL}$ ) y los resultados se expresaron en  $\text{mg}$  de ácido gálico por  $\text{g}$  de peso fresco.

Calidad de fruto. Se seleccionaron frutos al azar después de una cosecha, se verificó que no tuvieran daño físico, fueran uniformes y en estado de madurez 6 (rojo ligero) de acuerdo al patrón de color visual utilizada por la USDA. El potencial de hidrógeno (pH) se determinó utilizando un potenciómetro digital (HANNA®), los sólidos solubles ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) con un refractómetro digital PR-101ATAGO PALETTE. La acidez titulable (% de ácido cítrico) se calculó tomando 10 ml de pulpa de cada fruto, a la cual se añadieron 2 gotas de fenolftaleína (1%) y se tituló con NaOH 0.1 N (AOAC, 1990) (Figura 8). El contenido de licopeno en el fruto se cuantificó mediante la metodología citada

por Fish (2002). A 3 g de pericarpio del fruto fresco se agregan 3 mL de solución buffer de fosfatos (pH 7) y se muelen en un mortero, posteriormente se tomaron 2 mL de la muestra y 4 mL de la mezcla hexano:acetona (3:2) centrifugando durante 10 min a 3000 rpm. Por último, se determina la absorbancia a 503 nm del sobrenadante resultante que corresponde a los mg/100 g de peso fresco de licopeno. El contenido de Vitamina C se determinó por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol (AOAC, 1968). Se pesaron 10 g de fruto fresco y se maceraron en un mortero con 10 mL de HCl al 2%, después se filtró a través de una gasa absorbente estéril sobre un matraz de aforación de 100 mL. Se tomó una alícuota de 10 mL y se tituló con 2,6 diclorofenolindofenol hasta obtener una coloración rosácea persistente. Los resultados se expresaron en mg/100 g de peso fresco.



**Figura 8.** Determinación de acidez titulable, obtención de la pulpa de fruto y titulación de la muestra.

## **Diseño estadístico**

La unidad experimental fue una planta en una maceta. Para las variables agronómicas (altura de la planta, número de racimos, número de frutos, PSA y PSR) se midieron 20 unidades experimentales por cada tratamiento. En el caso de las variables bioquímicas y de calidad de fruto se consideraron cinco repeticiones por tratamiento. Para el desarrollo del experimento se usó un diseño completamente al azar. Para detectar la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó un ANOVA, adicionalmente se efectuó una prueba de separación de medias según LSD ( $p \leq 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos se trabajaron en el software estadístico SAS v9.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la aplicación de nanopartículas sobre variables agronómicas

Los resultados de la evaluación de las variables agronómicas son presentados en la Tabla 1. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias estadísticas en cuanto a la adición de NPs de Cu en quitosán-PVA en el rendimiento del cultivo, lo que demuestra que no se presentó toxicidad por ningún tratamiento.

Se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el peso seco de raíz, altura y número de frutos. Se observó que la aplicación de nCu en hidrogeles de quitosán-PVA incrementó en un 30% aproximadamente el peso seco de la raíz, mientras que con la aplicación de solo quitosán-PVA presentó un aumento del 25% aproximadamente ambos superiores al testigo (Tabla 1). Se reportó que el efecto de la aplicación de 600 mg L<sup>-1</sup> NPs de CuO en una concentración a 100 ppm incrementó el crecimiento de la raíz en un 34.4% en soya. Del mismo modo, para las plántulas de garbanzo, la dosis de 60 ppm promueve un aumento significativo de la raíz en un 22% (Adhikari *et al.*, 2012). Por su parte la aplicación de NPs de TiO<sub>2</sub> tuvo efectos significativos sobre el crecimiento de la raíz en lechuga, sin embargo los autores usaron la concentración de 100 mg/ kg<sup>-1</sup> en suelo (Umber *et al.*, 2015). También Méndez *et al.* (2016) reportaron que NPs de ZnO en concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> incrementaron la longitud de raíz en un 11.8% con respecto al control sin embargo la aplicación de NPs fue foliar. Por otra parte Nhan *et al.* (2014) reportaron un efecto negativo en la biomasa de la raíz de algodón transgénico tratado con 500 y 2000 mg L<sup>-1</sup> de NPs de SiO<sub>2</sub>. Esto indica que la aplicación de NPs tiene en general un efecto positivo sobre la raíz de las plantas, sin embargo, es dependiente de la especie vegetal usada.

Para el número de frutos, la aplicación de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA incrementó 17%, mientras que la aplicación de solo quitosán-PVA presento un aumento del 6.46% ambos superiores en relación al testigo. Esto coincide con Juárez-Maldonado *et al.* (2016), que reportan que las NPs de Cu a una concentración de 0.06 mg L<sup>-1</sup> incrementaron en un 22.84% el número de frutos en plantas de tomate.

En la altura de planta el testigo fue mejor en relación a los tratamientos de quitosán-PVA y NPs de Cu en un 3.5% y 3.4% respectivamente. Nhan *et al.* (2014) reportaron un efecto negativo en la altura de algodón transgénico tratado con 500 y 2000 mg L<sup>-1</sup> de NPs de SiO<sub>2</sub>. Esto sugiere que los diversos nanomateriales tienen diferentes efectos sobre las especies vegetales, y para el caso particular de la altura se observa un efecto negativo generalmente. En el resto de las variables evaluadas no se presentaron diferencias.

**Tabla 1.** Variables agronómicas evaluadas en plantas de tomate (Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas según LSD, p≤0.05).

Tratamiento	Rendimiento (g)	PSA (g)	PSR (g)	Altura (cm)	NR	NF
nCu	5352.01 A	342.48 A	20.83 A	200.63 B	6.44 A	30.5 A
Quitosán-PVA	5437.64 A	342.47 A	19.64 A	200.5 B	6.19 A	27.13 AB
T0	5607.37 A	322.76 A	14.58 B	207.69 A	6.19 A	25.38 B

T0: Testigo. nCu: 10 mg de NPs de Cu en 1 g de hidrogel de quitosán-PVA. PSA: Peso seco aéreo. PSR: Peso seco raíz. NR: Numero de racimos. NF: Numero de frutos.

### Efecto de la aplicación de nanopartículas sobre calidad de fruto

Los resultados de la evaluación de variables en calidad del fruto son presentados en la Tabla 2. Se encontraron diferencias estadísticas solamente en el contenido de vitamina C y licopeno. Se observó que la aplicación de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA incrementó el contenido de licopeno en un 44%, mientras que la aplicación de solo quitosán-PVA presentó un aumento del 6.64% ambos superiores al testigo. Se reportó que el efecto de la aplicación

de 0.06 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu aumentó el contenido de licopeno en un 25% (Juárez-Maldonado *et al.*, 2016), lo que coincide con los resultados observados.

Por otra parte el tratamiento de quitosán-PVA aumento el contenido de vitamina C en un 32.34 %, y las NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA un 29.2 % en comparación al testigo.

Estos resultados fueron similares a Uhram *et al.* (2013) quienes aplicaron nanopartículas de óxido de titanio a una concentración de 5000 mg kg<sup>-1</sup> lo cual dio como resultado una mayor actividad antioxidante en frutos, sin embargo, la aplicación fue en forma de aerosol, y en el presente estudio fue directo al sustrato. Esto sugiere que de manera general la aplicación de NPs tiene un efecto positivo sobre los compuestos antioxidantes tal y como se observó en este trabajo.

**Tabla 2.** Variables de calidad de fruto evaluadas en las plantas de tomate (Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas según LSD, p≤0.05).

Tratamiento	pH	SST (°Brix)	Acidez Titulable	Vitamina C	Licopeno
nCu	4.11 A	4.44 A	0.32 A	11.44 A	5.05 A
Quitosán-PVA	4.02 A	4.48 A	0.36 A	11.97 A	3.09 B
T0	4.07 A	4.24 A	0.36 A	8.10 B	2.85 B

T0: Testigo. nCu: 10 mg de NPs de Cu en 1 g de hidrogel de quitosán-PVA. PF: Peso fresco. Vitamina C (mg Ac. ascórbico/100 g de PF). SST: Sólidos Solubles Totales. Acidez Titulable (% Ac. Cítrico). Licopeno (mg/100 g de PF).

### Efecto de la aplicación de nanopartículas sobre pigmentos de la hoja

Los resultados para la evaluación de pigmentos en hoja son presentados en la Tabla 3. No se encontraron diferencias estadísticas en las variables contenido de clorofila a, clorofila b, clorofilas totales y carotenoides (LSD, p≤0.05).

Al contrario de Pradhan *et al.* (2015) quienes encontraron mayor contenido de clorofila y carotenoides en plantas de *Vigna radiata* tratadas con NPs de Cu



incluso en dosis de 1 mg/l, además mencionan que la aplicación de NPs de Cu en una dosis de 0.05 mg/l mejora la actividad de la luz, esto se traduce en una mayor efectividad fotosintética. Fernández y Henriques (1991) explican que tanto en plantas con deficiencia como con exceso de Cu, se produce un cambio en el contenido de clorofila ya que se altera la estructura del cloroplasto y composición de la membrana del tilacoide en hojas de espinaca, arroz, trigo y frijol en condiciones de crecimiento experimental.

**Tabla 3.** Pigmentos en la hoja evaluados en plantas de tomate (Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas según LSD, ( $p \leq 0.05$ )).

Tratamiento	Chla	Chlb	Clorofila total	Carotenoides
nCu	155.5 A	49.18 A	204.68 A	26.35 A
Quitósán-PVA	170.74 A	53.87 A	224.61 A	28.08 A
T0	171.21 A	51.82 A	223.02 A	29.49 A

T0: Testigo. nCu: 10 mg de NPs de Cu en 1 g de hidrogel de quitósán-PVA. Chla: Clorofila a ( $\mu\text{g/mL}$ ). Chlb: Clorofila b ( $\mu\text{g/mL}$ ). Clorofila total ( $\mu\text{g/mL}$ ). Carotenoides ( $\mu\text{g/mL}$ ).

### **Efecto de la aplicación de NPs de Cu sobre la actividad enzimática en fruto de tomate**

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática en frutos de tomate se presentan en la Tabla 4. Se encontraron diferencias estadísticas en el contenido de catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reducido en frutos de tomate. En ascorbato peroxidasa no se observaron diferencias entre tratamientos.

En la actividad de catalasa medida en fruto de tomate, el tratamiento de NPs de Cu en hidrogeles de quitósán-PVA fue aproximadamente 122% mayor con respecto al testigo. Juárez-Maldonado *et al.* (2016) reportan que la aplicación de  $0.06 \text{ mg L}^{-1}$  NPs de Cu en fruto de tomate no mostró diferencias en la actividad de CAT entre tratamientos, esto puede ser por el efecto de la concentración de NPs de Cu en comparación con el presente trabajo.

En cuanto a la actividad de glutatión peroxidasa y glutatión reducido, el tratamiento de quitosán-PVA presento el mayor valor para ambas variables, aumentando en un 25.55% y un 24.66% respectivamente en comparación al testigo. En GPX el tratamiento con NPs Cu también superó al testigo por 20.47% (Tabla 4). Juárez-Maldonado *et al.* (2016) reportan que la aplicación de 0.06 mg L<sup>-1</sup> NPs de Cu en fruto de tomate no mostró diferencias en el contenido de GPX y glutatión reducido entre tratamientos, lo cual puede ser debido a la baja concentración ya que en el presente estudio se aplicaron 10 mg de NPs Cu.

**Tabla 4.** Actividad antioxidante evaluada en fruto de tomate (Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas según LSD, p≤0.05).

Tratamiento	APX	Catalasa	GPX	Glutatión
nCu	152.77 A	35.03 A	4.69 A	64.47 B
Quitosán-PVA	137.92 A	19.66 B	5.01 A	86.23 A
T0	142.77 A	15.76 B	3.73 B	64.97 B

T0: Testigo. nCu: 10 mg de NPs de Cu en 1 g de hidrogel de quitosán-PVA. PT: Proteínas totales. APX: Ascorbato peroxidasa ( $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} / \text{mg de PT}$ ). Catalasa ( $\text{mM de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} / \text{mg de PT}$ ). GPX: Glutatión peroxidasa ( $\mu\text{M glutatión min}^{-1} / \text{mg de PT}$ ). Glutatión ( $\text{UI mg}^{-1} \text{ PT}$ ).

### Efecto de la aplicación de NPs de Cu sobre la actividad antioxidante en hoja de tomate

Respecto a la actividad enzimática en hojas del cultivo de tomate los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5. Se encontraron diferencias estadísticas en todas las variables evaluadas: ascorbato peroxidasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido, fenilalanina amonio liasa y fenoles en hoja de tomate (LSD, p≤0.05).

El tratamiento de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA presento los valores más altos en todas las variables con un aumento de 36.24% (APX), 110.95% (CAT), 27.25% (GPX), 36.79% (Glutatión) y 38.54% (PAL) con respecto a los valores del testigo. En fenoles el tratamiento quitosán-PVA

también superó al testigo por 37.69% (Tabla 5). Estos resultados sugieren que la aplicación de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA tiene un efecto positivo en la generación de antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos en las plantas de tomate, ya que aumentó significativamente el contenido GPX, APX, CAT, glutatión y fenoles totales. Trujillo-Reyes *et al.* (2014) reportaron una disminución en la actividad de ascorbato peroxidasa con la aplicación de 20 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu en hojas de lechuga, además con la concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu disminuyó la actividad de ascorbato peroxidasa en la raíz, contrario a lo observado en este estudio, esto sugiere que Cu induce estrés oxidativo en lechuga, pero en otras plantas puede inducir el efecto opuesto.

Trujillo-Reyes *et al.* (2014) reportaron un incremento de la actividad de catalasa en hoja de lechuga con la concentración 10 mg L<sup>-1</sup> de NPs de Cu, resultado consistente con lo observado aquí. Por el contrario, Juárez-Maldonado *et al.* (2015) reportaron que la aplicación 0.06 g L<sup>-1</sup> de NPs de Cu en lechuga no presentó diferencias significativas entre tratamientos en las variables catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y glutatión, evaluadas en las hojas, sin embargo, se observó una clara tendencia de disminución en catalasa (45%) y glutatión (37%) con la aplicación de NPs de Cu en comparación con el testigo. En cuanto a fenoles reportan que el tratamiento de NPs de Cu presentó el valor más bajo en comparación a su tratamiento de solo quitosán-PVA. También Juárez-Maldonado *et al.* (2016) reportan que con la aplicación de NPs de Cu no se presentaron diferencias significativas en el contenido de GPX, APX, CAT, glutatión y fenoles totales en fruto de tomate. Estos resultados sugieren que las diversas concentraciones de NPs de Cu tienen diferentes efectos sobre las especies vegetales, además, las distintas vías de aplicación pueden sugerir una modificación en la efectividad de los nanomateriales.

González-Peña *et al.* (2014) reportan que la imbibición de semilla de tomate en quitosán en concentración 0.1 g L<sup>-1</sup> causó el incremento de PAL por encima del control. Estos resultados indican que la actividad de PAL es importante en la

expresión de la respuesta de defensa contra patógenos, lo que significa que la aplicación de NPs Cu en hidrogeles de quitosán-PVA puede incrementar la tolerancia a patógenos en tomate, ya que como se observó en el presente estudio, la actividad de PAL se incrementó significativamente.

**Tabla 5.** Actividad antioxidante evaluada en hoja de tomate (Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas según LSD,  $p \leq 0.05$ ).

Tratamiento	APX	CAT	GPX	Glutación	PAL	Fenoles
<b>nCu</b>	108.17 A	16.37 A	3.34 A	89.51 A	135.55 A	2.64 A
<b>Quitosán-PVA</b>	65.28 B	8.02 B	2.31 B	57.39 B	79.09 B	2.76 A
<b>T0</b>	68.98 B	7.76 B	2.43 B	56.58 B	83.32 B	1.72 B

T0: Testigo. nCu: 10 mg de NPs de Cu en 1 g de hidrogel de quitosán-PVA. PT: Proteínas totales. APX: Ascorbato peroxidasa ( $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1}/\text{mg PT}$ ). CAT: Catalasa ( $\text{mM de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}/\text{mg PT}$ ). GPX: Glutación peroxidasa ( $\mu\text{M glutación min}^{-1}/\text{mg PT}$ ). Glutación ( $\text{UI mg}^{-1} \text{ PT}$ ). PAL: Fenilalanina amonio liasa ( $\mu\text{g/mL ácido trancinámico}$ ). Fenoles ( $\text{mg Ac. Galico/g}$ ).

## CONCLUSIONES

La aplicación de hidrogeles de quitosán-PVA con y sin NPs de Cu tuvo un efecto positivo en el peso seco de raíz y número de frutos, parámetros relacionados con el vigor de la planta de tomate.

En cuanto a calidad de fruto, la aplicación de hidrogeles de quitosán-PVA con y sin NPs de Cu resultó en un aumento en el contenido de vitamina C, mientras que en el contenido de licopeno solo tuvo un efecto positivo con la aplicación de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA.

La aplicación de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA aumentó el contenido de APX, CAT y GPX, en fruto de tomate, en el caso del contenido en hoja de tomate aumento el valor de APX, CAT, GPX, glutatión reducido, PAL y fenoles totales.

El tratamiento de quitosán-PVA incremento el contenido de glutatión reducido en fruto y el contenido de fenoles totales en hoja de tomate.

En cuanto al contenido de pigmentos en hojas de tomate, los resultados mostraron que la aplicación de NPs de Cu en hidrogeles de quitosán-PVA no tiene ningún efecto.

La aplicación de hidrogeles de quitosán-PVA y NPs de Cu genera efectos positivos en el contenido de compuestos antioxidantes y características nutricionales en tomate.

## LITERATURA CITADA

- Adhikari, T., Kundu, S., and Rao, A. S. 2013. Impact of SiO<sub>2</sub> and Mo Nano Particles on Seed Germination of Rice (*Oryza Sativa* L.). *International Journal of Agriculture and Food Science Technology* 4: 809-816.
- Adhikari, T., Kundu, S., Biswas, A.K., Tarafdar, J.C and Rao, A.S. 2012. Effect of Copper Oxide Nano Particle on Seed Germination of Selected Crops. *Journal of Agricultural Sciencia and Technology* 2: 815-823.
- AOAC. 1968. A. Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices 2,6 Dichloroindophenol Titrimetric Method. (2006). *Off Method Anal Of AOAC Int. AOAC Offic*(45.1.14):1-2.
- Aouada, F.A. and M.R. Moura. 2015. Nanotechnology applied in agricultura: controlled reléase of agrochemicals. *Nanotechnologies in Food and Agriculture* 102-118.
- Ávalos-García, A y Pérez-Urria, E . 2009. Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología). Fisiología vegetal* 2(3): 119-145.
- Baba, Y. 2006. Nanotechnology in medicine, *Nihon Rinsho* 64: 189-98.
- Beers, R. F. and Sizer, I.W. 1952. Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide By. *J Biol Chem* 195:133-140.
- Betancourt-Galindo, R., Reyes-Rodríguez., P. Y., Puente-Urbina., B. A., Avila-Orta., C. A., Rodríguez-Fernández., O. S., Cadenas-Pliego., G., Lira-Saldivar., R. H and García-Cerda, L. A. 2013. Synthesis of Copper Nanoparticles by Thermal Decomposition and Their Antimicrobial Properties. *Journal of Nanomaterials* 5.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. 1997. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* 59: 527-535.

- Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K and Acharya, K. 2015. Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. *Sci Rep* 5, 15195.
- Dat, J., Vandenameele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 57: 779-795.
- De-Gara, L., Pinto, M.C. and Arrigoni, O. 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100: 894-900.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di-lucca, G and Grolier, P. 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 369-382.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I and Daayf, F. 2010. Chitosan in plant protection. *Mar Drugs* 8, 968-87.
- Erro-Urrutia, J. 2011. La seguridad y la salud en la exposición a nanopartículas. 1er Edición. Instituto Riojano de Salud Laboral. España. 50: 5-9.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Gad, N. and Hassan, N.M.K. 2013 en: Juárez-Maldonado (2013). Modelos matemáticos para el manejo del riego y nutrición del cultivo de tomate (*lycopersicon esculentum* mill.) en invernadero. Tesis para obtener el

grado de Doctor en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de Producción.  
UAAAN. Saltillo, Coahuila. 1.

González-Peña, D., Costales, D and Falcón, B. 2014. Influence of a chitosan polymer in the growth and the induction of defensive enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos tropicales* 35(1) La Habana.

Garnett, M and Kallinteri, P. 2006. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup. Med* **56**: 307-311.

Gordon, M.H. 2001. El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos (pp. 7-21) en: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. Ed. Acribia.

Gutteridge, J. and Halliwell, B. 1999. Reactive oxygen species in biological systems. New York, USA: D.L. Gilbert and C.A. Colton, eds. 189-218.

Halliwell, B. and Gutteridge-J, M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 5<sup>ta</sup> ed. London. 364-366.

Hart, D. J. and Scott, K. J. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoide content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem* 54: 101-111.

Ingeborg, A and Kare, B. 2014. Nanotechnology in agriculture. *Encyclopedia of Food and Agricultural Ethics*. 1417-1423.

Internacional, A. 1990. *AOAC: Official Methods of Analysis*. 1.



- Jaiswal, M., Chauhan, D and Sankararamakrishnan, N. 2012. Copper chitosan nanocomposite: synthesis, characterization, and application in removal of organophosphorous pesticide from agricultural runoff. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 2055-2062.
- Jonson, I.T., Southon, S. y Faulks, R. 2001. Predicción de la biodisponibilidad de los antioxidantes de los alimentos: el caso de los carotenoides. (119-137), en: Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. Zaragoza: Ed. ACRIBIA.
- Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Benavides-Mendoza, A., Cadenas-Pliego, G y Pérez-Labrada, F. 2015. Efecto de la aplicación de hidrogeles de quitosán nCu sobre los compuestos antioxidantes en tomate. *En "Simpósio Iberoamericano de Quitina" (S. i. d. quitina, ed.)*, pp. 90, Nuevo Vallarta, Nayarit, México.
- Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Pérez-Labrada, F., Cadenas-Pliego, G and Benavides-Mendoza, A. 2016. Cu Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 89: 183-189.
- Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Cadenas-Pliego, G., Pérez-Labrada, F y Benavides-Mendoza, A. 2015. Efecto en el rendimiento, contenido de minerales y compuestos antioxidantes en lechuga con aplicación de nanopartículas de Cu absorbidas en hidrogeles de quitosán. *Extenso. XX Congreso internacional de plásticos en la agricultura en XV congreso iberoamericano para el desarrollo y la aplicación de plásticos en la agricultura*. Pp. 1-6. Saltillo, Coahuila. México.

- Karunaratne, D. N. 2007. Nanotechnology in medicine. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 35: 149-152.
- Kaveh, R., Li, Y. S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C. L and Van Aken, B. 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ Sci Technol* 47(10): 37-44.
- Khan, W., Prithviraj, B and Smith, D. L. 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J Plant Physiol* 160: 859-63.
- Khodakovskaya, M. V., Silva, K. D., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V., Galanzha, E. I and Zharov, V. P. 2011. Complex genetic photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(3): 1028–1033.
- Le, V. N., Rui, Y., Gui, X., Li, X., Liu, S and Han, Y. 2014. Uptake, transport, distribution and Bio-effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles in Bt-transgenic cotton. *Journal of Nanobiotechnology* 12: 15.
- Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Miinster, A and Danilenko, M. 1995. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either  $\alpha$ - or  $\beta$ -carotene. *Nutr Cancer* 24: 257-266.
- Limbach, L., Wick, P., Manser, P., Grass, R., Bruinink, A and Stark, W. 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ. Sci. Technol* 41: 4158-4163
- Lugo-Medina, E., García-Gutiérrez, C., y Ruelas-Ayala, R.D. 2010. Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas. *Ra Ximhai* 6(1): 63-67.

- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Komakov, A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of Total Environment* 16(408): 3053-3061.
- Medina-M, M.E., Galván-R, L.E., y Reyes-G, R.E. 2015. Las nanopartículas y el medio ambiente. *Revista Scielo. Ciencia y tecnología* 19(74): 49-58.
- Méndez- Arguello, B., Vera-Reyes, I., Mendoza-Mendoza, E., Garcia-Cerda, L. A., Puente-Urbina, B. A y Lira-Saldívar, R. H. 2016. Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annuum* por nanopartículas de óxido de zinc. *Nova Scientia* 8(2): 140-156.
- Narayanan, A., sharma, P and Moudgil, B. M. 2013. Applications of engineered particulate systems agriculture and food industry. *KONA Powder and Particle* 30: 221-235.
- Nekrasova, G. F., Ushakova, O. S., Ermakov, A. E., Uimin, M. A and Byzov, I. V. 2011. Effects of copper(II) ions and copper oxide nanoparticles on *Elodea densa* Planch. *Russian Journal of Ecology* 42: 458-463.
- Nhan Le, V., Rui, Y., Gui, X., Li, X., Liu, S and Han, Y. 2014. Uptake, transport, distribution and Bio-effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles in Bt-transgenic cotton. *Journal of Nanobiotechnology* 12: 50.
- Palomo, I., Fuentes, E., Carrasco, G., González, D y Carrasco, R. 2010. Actividad antioxidante, hipolipemiente y antiplaquetaria del tomate (*solanum lycopersicum l.*) y el efecto de su procesamiento y almacenaje. *Revista Chilena de Nutrición* 37(4): 524-533.
- Peralta-Pérez, M-del-R y Volke-Sepúlveda, T.L. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química* 11(1): 75-88.

- Pérez, E., Rodríguez, Y., Hernández, M y de-la-Noval, B. 2004. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*lycopersicon esculentum* mill.) var. amalia. I. inducción de pr2, pr3 y fenilalanina amonio-liasa en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales* 25(2): 37-44.
- Perez-Gastell, P.L y Pérez de Alejo, J.L. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev. Cubana Medicina Militar* 29: 192-198.
- Pradhan, S., Patra, P., Mitra, S., Dey, K. K., Basu, S., Chandra, S., Palit, P and Goswami, A. 2015. Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced toxicity response: a biophysical and biochemical outlook on *Vigna radiata*. *J Agric Food Chem* 63: 2606-2617.
- Porra, R. J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res* 73(1-3):149-156. doi:10.1023/A:1020470224740.
- Pramod, M., Dhoke, S.K., Khanna, A.S and Tarafdar, J.C. 2011. Effect of nano-ZnO on growth of mung bean (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Applied Biological Research* 13(2): 54-61.
- Quintili, M. 2012. Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Revista Scielo* 42(1): 125-155.
- Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalh, G. S and Oliveira, C. 2010. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant soil environ* 56: 584–588.

Ríos-de-Molina, M. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista QuímicaViva* 2(1).

SAGARPA, 2012. Agricultura Protegida. Available in <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura-Protegida2012.aspx> [26 January 2013].

SAGARPA. 2010. Jitomate. Monografía de Cultivos. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios. México D.F.

Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R and Biswas, P. 2015. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *Int Journal Biol Macromol* 75: 346-53.

Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995-1014.

Selvaraj–Karthick, R. N. 2015. Comparative evaluation of non target toxic effect of free and polymer coated chemogenic metallic nanoparticles against *Vigna mungo*. *International journal of pharma and bio sciences* 6(1): 461-467.

Shi, H., Noguchi, N. y Niki, E. 2001. Introducción a los antioxidantes naturales. (141-151), en: Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. Zaragoza: Ed. ACRIBIA.

Shi, J. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40: 1-42.

- Shi, J., Peng, C., Yang, Y., Yang, J., Zhang, H., Yuan, X., Chen, Y and Hu, T. 2014. Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens*. *Nanotoxicology* 8(2):179-188.
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W and Parker, L. 1994. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin, en: *Journal of Investigative Dermatology* 102: 122-124.
- Singleton, V. L and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Journal Enol Vitic* 16:144-158.
- Somasundaran, P., Fang, X., Ponnurangam, S and Li, B. 2010. Nanoparticles: Characteristics, Mechanisms and Modulation of Biototoxicity. *KONA Powder and Particle* 28: 38-49.
- Solanki, P., Bhargava, A., Chhipa, H., Jain, N and Panwar., J. 2015. Nanofertilizers and their Smart delivery system. *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. 81-101.
- Southon, S y Faulks, R. 2001. Predicción de la biodisponibilidad de los antioxidantes de los alimentos: el caso de los carotenoides. (119-137), en: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A and Naliwajski, M. R. 2012. Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 48(5): 555-564. doi:10.1007/s11627-012-9443-2.

- Trujillo-Reyes, J., Majumdar, S., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R and Gardea-Torresdey, J. L. 2014. Exposure studies of core-shell Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard. *Journal Hazard Mater* 267: 255-63.
- Uhram, C., Junio, E., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J and Ju Lee, E. 2013. Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO<sub>2</sub> and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Journal Food Sci* 93: 60-67.
- Umber, H.H., Arshad, M., Arif A., Ahmed, N and Ahmed, Q. 2015. Phyto-availability of phosphorus to *Lactuca sativa* in response to soil applied TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 52(1): 177-182.
- Veiga-Álvarez, A., Sánchez-de-Alcázar, D., Martínez-Negro, M., Barbu, A., González-Díaz, J.B y Maquea-Blasco, J. 2015. Riesgos para la salud y recomendaciones en el manejo de nanopartículas en entornos laborales. *Revista Scielo. Medicina y Seguridad del trabajo* 61(239): 143-161.
- Venereo-Gutiérrez, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”. *Revista Cubana Medicina Militar* 31(2):126-33.
- Waliszewski, K y Blasco, G. 2010. Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud pública de México* 52(3): 254-265.
- Wellburn, A. R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal Plant Physiology* 144(3): 307-313.
- Zapata, B., Gerard, L., Davies, C y Schvab, M. 2007. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 35: 173-193.

Záyago–Lau, E y Foladori, G. 2010. La Nanotecnología en México: un desarrollo incierto. Revista Scielo. Economía, sociedad y desarrollo 10(32).

Zhang, H., Wang, J., Nickel, U., Allen, R. D and Goodman, H. M. 1997. Cloning and expression of an Arabidopsis gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. Plant Molecular Biology 34: 967-971.