

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PARTÍCULAS MICRO Y NANOMÉTRICAS DE  
ÓXIDO DE CINC SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL DESARROLLO VEGETATIVO  
DEL AJÍ JALAPEÑO (*Capsicum annuum* L.)



SANTIAGO DURÁN FERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2022

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PARTÍCULAS MICRO Y NANOMÉTRICAS DE  
ÓXIDO DE CINC SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL DESARROLLO VEGETATIVO  
DEL AJÍ JALAPEÑO (*Capsicum annuum* L.)

SANTIAGO DURÁN FERNÁNDEZ

Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo

Director:

JORGE ENRIQUE RODRÍGUEZ PÁEZ, Ph.D.

Asesor:

OSCAR DARÍO BERMÚDEZ ZAMBRANO, M.Sc.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

Director: \_\_\_\_\_  
Jorge Enrique Rodríguez Páez, Ph.D.

Jurado: \_\_\_\_\_  
Lyda Patricia Mosquera Sánchez, Ph.D. (c)

Jurado: \_\_\_\_\_  
Fabio Alonso Prado Cerón, M.Sc.

Popayán, 22 de abril de 2022

## DEDICATORIA

*A mis sobrinos, Sara y Josué.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi padre, madre, hermanos y abuelas, que siempre me han brindado su apoyo y amor incondicional.

A mi director, el profesor Jorge Rodríguez y a mi asesor, el profesor Oscar Bermúdez, quienes son excelentes maestros y grandes seres humanos.

Al Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Materiales Cerámicos (CYTEMAC) de la Universidad del Cauca por proporcionarme los equipos, materiales y reactivos durante el proceso experimental.

A la Universidad del Cauca y al Programa de Biología por impartir mi formación profesional y por permitir los espacios y elementos necesarios para la realización de este trabajo de investigación.

Al profesor Edwin Rengifo y al profesor Yilton Riascos por brindar su asesoría en el análisis estadístico de los datos.

Al ingeniero Jaumer Ricaurte, coordinador del Laboratorio de Fisiología Vegetal del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por facilitarme el medidor de área foliar.

Al Grupo de Investigación en Agroquímica de la Universidad del Cauca por facilitarme el equipo para secar las plantas.

A la Unidad de Análisis Industrial del Departamento de Química de la Universidad del Cauca por permitirme utilizar los equipos para caracterizar algunas propiedades de las nanopartículas sintetizadas.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	12
1. JUSTIFICACIÓN .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. Objetivo general .....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MARCO TEÓRICO .....	17
3.1. Características de <i>Capsicum annuum</i> L. ....	17
3.1.1. Desarrollo fenológico de <i>Capsicum annuum</i> L.....	17
3.2. Macronutrientes y micronutrientes .....	19
3.2.1. El cinc (Zn) como micronutriente .....	19
3.2.2. Toxicidad del cinc .....	21
3.3. La nanotecnología y los nanomateriales.....	21
3.3.1. Las nanopartículas .....	22
3.3.2. Método de síntesis de ZnO-NPs mediante el complejo polimérico – Pechini .....	22
3.3.3. Técnicas de caracterización de nanopartículas .....	23
3.4. Las ZnO-NPs y su interacción con las plantas.....	25
3.4.1. Efectos benéficos .....	26
3.4.2. Efectos tóxicos .....	26
4. ANTECEDENTES .....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Síntesis de ZnO-NPs.....	29
5.2. Caracterización del material pulverulento .....	30
5.2.1. Análisis termogravimétrico (ATG) y análisis térmico diferencial (ATD).....	30
5.2.2. Espectroscopía de absorción en ultravioleta-visible (UV-Vis) .....	31
5.2.3. Espectroscopía de absorción infrarroja (IR) .....	31
5.2.4. Difracción de rayos X (DRX).....	32
5.2.5. Microscopía electrónica de barrido .....	32
5.3. Adquisición de micropartículas de ZnO.....	32
5.4. Obtención y desinfección del material vegetal .....	32
5.5. Selección de tratamientos.....	33
5.6. Efecto del óxido de cinc (ZnO) sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de <i>C. annuum</i> .....	34
5.6.1. Efecto del ZnO sobre la germinación de semillas .....	34

5.6.2.	Variable estimada.....	34
5.6.3.	Efecto del ZnO sobre el crecimiento de plántulas de <i>C. annuum</i> .....	35
5.7.	Determinación del efecto de partículas ZnO adicionadas al sustrato sobre el desarrollo vegetativo adulto de plantas de <i>C. annuum</i> .....	35
5.7.1.	Preparación del sustrato y constitución de los tratamientos.....	36
5.7.2.	Obtención de plántulas.....	36
5.7.3.	Establecimiento de plántulas en el sustrato.....	37
5.7.4.	Variables estimadas.....	37
5.8.	Diseño experimental y análisis estadístico.....	37
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1.	Síntesis de ZnO-NPs.....	39
6.2.	Caracterización del material cerámico sintetizado.....	41
6.2.1.	Análisis termogravimétrico (ATG) y análisis térmico diferencial (ATD).....	41
6.2.2.	Espectroscopía de absorción en ultravioleta visible (UV-Vis).....	43
6.2.3.	Espectroscopía de absorción infrarroja (IR).....	44
6.2.4.	Difracción de rayos X.....	45
6.2.5.	Microscopía electrónica de barrido.....	46
6.3.	Efecto del óxido de cinc (ZnO) sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de <i>C. annuum</i> .....	48
6.3.1.	Número de semillas germinadas.....	48
6.3.2.	Longitud de la raíz y tallo de las plántulas expuestas a partículas de ZnO.....	51
6.3.3.	Peso seco de la raíz y el tallo de las plántulas.....	53
6.3.4.	Correlación entre la longitud y el peso seco de la raíz y el tallo de las plántulas.....	54
6.4.	Efecto de la aplicación de partículas de ZnO en sustrato sobre el desarrollo vegetativo adulto de <i>C. annuum</i> .....	57
6.4.1.	Efecto sobre el desarrollo foliar.....	57
6.4.2.	Efecto sobre el desarrollo de yemas florales.....	61
6.4.3.	Efecto de las partículas de ZnO sobre la raíz y el tallo en la fase vegetativa adulta.....	63
6.4.4.	Correlación entre la longitud y el peso seco de la raíz y la parte aérea de las plantas.....	68
6.5.	Consideraciones finales.....	69
7.	CONCLUSIONES.....	72
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	74

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Análisis estadístico para las variables estimadas en <i>C. annuum</i> sometido a tratamientos con diferentes concentraciones de ZnO-NPs o ZnO-MPs.	38
<b>Tabla 2.</b> Valores promedio de las variables estimadas en plántulas de <i>C. annuum</i> , obtenidas a partir de semillas tratadas con ZnO, constituido por nanopartículas o micropartículas de ZnO.....	56
<b>Tabla 3.</b> Número de hojas y yemas florales en plantas de <i>C. annuum</i> , sembradas en sustrato suplementado con ZnO constituido por nanopartículas o micropartículas... ..	63
<b>Tabla 4.</b> Valores promedio de variables estimadas en las plantas de <i>C. annuum</i> , transcurridos 126 días de establecidas en sustrato suplementado con nanopartículas o micropartículas de ZnO.....	71



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema que ilustra las etapas del desarrollo de <i>C. annuum</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Curva de valoración potenciométrica y curva de variación de la temperatura obtenidas para la síntesis de ZnO-NPs, utilizando el método de Pechini, (1967) modificado.....	41
<b>Figura 3.</b> Análisis térmico del pre-calcinado .....	43
<b>Figura 4.</b> Espectro UV-Vis obtenido para polvo de ZnO sintetizado.....	44
<b>Figura 5.</b> Espectro de absorción IR obtenido para ZnO-NPs.....	45
<b>Figura 6.</b> Difractograma de rayos X del ZnO sintetizado.....	46
<b>Figura 7.</b> Micrografías Micrografías MEB de los polvos de ZnO obtenidos y análisis químico elemental .....	47
<b>Figura 8.</b> Desarrollo de plántulas de <i>C. annuum</i> provenientes de semillas sometidas a los tratamientos.....	50
<b>Figura 9.</b> Número de semillas de <i>C. annuum</i> germinadas, transcurridos 7 y 14 días de exposición a tratamientos .....	51
<b>Figura 10.</b> Longitud promedio de la raíz principal y tallo en plántulas de <i>C. annuum</i> , obtenidas a partir de semillas tratadas.....	52
<b>Figura 11.</b> Peso seco de raíz y tallo en plántulas de <i>C. annuum</i> , obtenidas de semillas expuestas a los tratamientos.....	54
<b>Figura 12.</b> Correlación entre la longitud de la raíz principal y su peso seco y correlación entre la longitud del tallo y su peso seco de las plántulas de <i>C. annuum</i> .....	55

**Figura 13.** Número promedio de hojas en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato..... 59

**Figura 14.** Área foliar promedio de plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato.....60

**Figura 15.**Número promedio de yemas florales en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato..... 62

**Figura 16.** Longitud promedio de la raíz principal y del tallo en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato ..... 65

**Figura 17.** Peso seco de la raíz y del tallo, en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato..... 67

**Figura 18.** Correlación entre la longitud de la raíz principal y su peso seco y correlación entre la longitud del tallo y su peso seco de las plantas de *C. annuum*.....68

## RESUMEN

*Capsicum annuum* L. tipo jalapeño, es una especie que contiene compuestos bioactivos de interés, entre ellos terapéutico, y su cultivo en Colombia sustenta la economía de muchos hogares campesinos. Considerando su cultivo, el déficit del micronutriente cinc (Zn), en esta especie, puede causar problemas en su desarrollo. Es por ello que, actualmente, se investiga el uso de las nanopartículas (1-100 nm) de ZnO (ZnO-NPs) como potenciales fertilizantes. No obstante, existe una preocupación generalizada por el impacto nocivo que pudiera tener la liberación accidental o deliberada de nanopartículas sobre las plantas. Para aportar a esta temática, en este estudio, se planteó como objetivo general determinar el efecto de tratamientos de ZnO constituido por nanopartículas (ZnO-NPs) o micropartículas (ZnO-MPs), en concentraciones de 0, 10, 20, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> ó mg Kg<sup>-1</sup>, sobre el desarrollo vegetativo juvenil y adulto de *C. annuum*. Para ello se sintetizaron las nanopartículas de ZnO, que presentaron un tamaño de partícula <100 nm, y se adquirieron comercialmente las ZnO-MPs. A continuación, se evaluó el efecto de los tratamientos con estas partículas de ZnO sobre el desarrollo vegetativo juvenil de *C. annuum*, a los 14 días después de su exposición (dde) a los mismos. Se encontró que estos no afectaban la germinación de las semillas, pero sí el desarrollo posterior de las plántulas. Como sucedió, con la reducción en longitud de raíz para plántulas provenientes de semillas tratadas con 20, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-NPs y 10, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-MPs. Así mismo, el ZnO ocasionó la reducción en peso seco del tallo, en plántulas originadas de semillas expuestas a 10, 20 y 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-NPs y 10, 100 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-MPs. No obstante, la longitud del tallo aumentó en plántulas obtenidas de semillas expuestas a 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-NPs y 20, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-MPs. Para determinar el efecto del ZnO sobre el desarrollo vegetativo adulto, se establecieron plántulas en sustrato suplementado con los tratamientos indicados, durante 126 días. Transcurrido este periodo, se observó una inhibición en el desarrollo de plántulas ocasionada por la exposición a 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO, independientemente de su constitución como NPs o MPs. Esta concentración, además, redujo el valor de otras variables de desarrollo, como: número de hojas, área foliar, número de yemas florales y peso seco del tallo. Por otro lado, la acumulación de biomasa en la raíz se vio afectada por la exposición a ZnO-NPs, a una concentración de 200 mg L<sup>-1</sup>, y a ZnO-MPs en concentraciones de 10, 50 y 200 mg Kg<sup>-1</sup>, ocasionando un efecto adverso sobre el desarrollo vegetativo adulto de *C. annuum*. Por lo tanto, se puede concluir que el efecto del ZnO, considerando concentración y tamaño, dependió del estado de desarrollo de *C. annuum*.

**PALABRAS CLAVE:** *Capsicum annuum*, nanopartículas de óxido de cinc, fitotoxicidad, nanofertilización.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, la domesticación y selección genética en el género *Capsicum*, ha permitido la obtención de genotipos pungentes y no pungentes, conocidos como ají y pimentón, respectivamente (Kim et al., 2014). Dentro de este género existen especies de gran interés, como *Capsicum annuum* L., la cual presenta un alto valor nutritivo y contiene numerosos metabolitos con propiedades farmacológicas, útiles para el tratamiento de diversas enfermedades (Antonio et al., 2018; Olatunji y Afolayan, 2018).

En Colombia, este cultivo representa una parte importante de la producción agrícola, ya que durante el año 2020 se cosecharon 101195 t (MADR - Agronet, 2021) y en el año 2019 se exportaron 3269 t de ají (Minagricultura, 2020). Sin embargo, el volumen de producción aún no es suficiente para competir con grandes exportadores de la región, como Estados Unidos y México (FAO, 2020). Por lo tanto, para mejorar la competitividad del sector, es necesario promover la siembra de variedades con alta demanda internacional, como lo es el ají jalapeño (Araujo et al., 2010; Pichardo-González et al., 2018).

Actualmente, para poder obtener un cultivo rentable de *C. annuum*, se utilizan agroquímicos como fertilizantes, fungicidas y plaguicidas, los cuales pueden propiciar efectos nocivos en el medio ambiente y la salud humana (do Rêgo et al., 2016; Sellare et al., 2020). Por lo tanto, es necesario investigar alternativas que permitan obtener una producción sustentable del cultivo (Samaranayake et al., 2020). En este sentido, se busca mejorar la eficiencia y disminuir la cantidad de agroquímicos utilizados haciendo uso de la nanotecnología, la cual se encarga de implementar técnicas que permiten la manipulación de la materia que presente un tamaño entre 1 y 100 nm (Flores-Villaseñor et al., 2016).

Específicamente, se está investigando la aplicación de nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs) como nano-fertilizantes, ya que siendo el cinc (Zn) un micronutriente para las plantas y dada su alta reactividad, las ZnO-NPs podrían aportar este elemento eficientemente en comparación con los fertilizantes tradicionales (Singh et al., 2018). No obstante, las nanopartículas podrían ocasionar un impacto perjudicial sobre las plantas y por ello, también, es necesario evaluar su toxicidad (Tripathi et al., 2018).

Es por esto que, en este estudio, se evaluó comparativamente el efecto que tenían las partículas nanométricas y micrométricas de ZnO sobre la germinación de las semillas y el desarrollo vegetativo juvenil y vegetativo adulto de *Capsicum annuum* L.

## 1. JUSTIFICACIÓN

Además de su valor nutritivo y gastronómico, *C. annuum* posee compuestos bioactivos de interés medicinal (Antonio et al., 2018; Olatunji y Afolayan, 2018). En este sentido, se ha encontrado que el extracto de *C. annuum*, en condiciones *in vitro*, reduce hasta 10 veces la carga de ARN del virus SARS-CoV-2 (De Pellegrin et al., 2021). Por otro lado, esta especie contiene metabolitos como capsaicinoides, carotenoides y flavonoides, que pueden ayudar a prevenir, tratar y controlar enfermedades como el cáncer, la diabetes y la hipertensión (Antonio et al., 2018; Chen y Kang, 2014; Hassan et al., 2019; Luo et al., 2011).

Para obtener una producción adecuada de *C. annuum*, se requieren condiciones nutricionales óptimas (do Rêgo et al., 2016). En particular, en esta especie, la deficiencia del micronutriente Zn, ocasiona el desarrollo de plantas con fenotipos enanos arrosetados y hojas pequeñas, que presentan clorosis intervenal (Balakrishnan, 1999; do Rêgo et al., 2016). No obstante, la exposición a altas concentraciones de Zn también puede provocar retraso en el crecimiento y clorosis, que se extiende desde las hojas jóvenes hasta las más longevas (Kaya et al., 2018; Nagajyoti et al., 2010).

En Colombia, algunos de los suelos aptos para el cultivo de *C. annuum* pueden presentar déficit de Zn. Este es el caso en los Llanos Orientales y en los valles interandinos de los ríos Magdalena, Cauca y Patía, debido a que, generalmente, sus suelos se caracterizan por tener un pH básico, lo cual dificulta la absorción de Zn en las plantas (Alloway, 2008; Bonilla C, 1994; Escobar et al., 2004). Tal deficiencia se suple, por lo regular, utilizando fertilizantes convencionales como el sulfato de cinc y el óxido de cinc (Robson, 1993). Sin embargo, el sulfato de cinc tiene alta movilidad en el suelo (Gangloff et al., 2006) y su uso excesivo causa contaminación en el medio ambiente (Lahive et al., 2011). Por otra parte, el ZnO

comercial posee baja solubilidad, condición que afecta su disponibilidad para la planta (McBeath y McLaughlin, 2014; Robson, 1993).

Es por ello que la utilización de las ZnO-NPs, como nano-fertilizante, se plantea como alternativa prometedora ya que podría ayudar a reducir los impactos ambientales. Esto debido a que, dada su mayor reactividad y la liberación controlada de Zn, permitirían reducir la frecuencia y cantidad de fertilizante empleado (Yang et al., 2021). No obstante, los efectos deben ser contrastados con las consecuencias indeseables que puedan tener las nanopartículas sobre las plantas (Tao et al., 2021), ya que pueden representar un riesgo de toxicidad y acumulación en la cadena trófica, debido a que las plantas son organismos de producción primaria (Rajput et al., 2020b; Rico et al., 2011).

En consecuencia, esto ha llevado a que se realicen numerosas investigaciones que evalúan el efecto de las ZnO-NPs sobre varias especies de plantas, pero aún existen vacíos en el conocimiento, porque, generalmente, no se compara su efecto con partículas de mayor tamaño, denominadas micropartículas (García-Gómez y Fernández, 2019), y además, el estudio normalmente se limita a las etapas tempranas en el desarrollo, como la germinación y el desarrollo de plántulas (V. Singh et al., 2021).

Por lo anteriormente mencionado, este estudio aporta al conocimiento del efecto del ZnO, en el desarrollo vegetativo juvenil y adulto, sobre *C. annuum*, utilizando concentraciones ambientalmente relevantes y considerando el efecto del tamaño de partícula de ZnO, nano y micropartículas. Los resultados de este trabajo pueden servir como referentes y utilizarse como base en futuras investigaciones que evalúen la producción y el mejoramiento de las condiciones de cultivo de esta especie.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de partículas nano y micrométricas de óxido de cinc sobre la germinación y el desarrollo vegetativo de plantas de ají jalapeño (*Capsicum annuum* L.).

### 2.2. Objetivos específicos

- Estructurar un método reproducible y controlable para sintetizar nanopartículas de óxido de cinc con características predeterminadas.
- Determinar el efecto de partículas micro y nanométricas de óxido de cinc sobre la germinación de semillas de *C. annuum*.
- Comparar el efecto de nanopartículas sintetizadas y partículas micrométricas de óxido de cinc sobre el desarrollo vegetativo de *C. annuum*.



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Características de *Capsicum annuum* L.

*Capsicum annuum* L. es una planta domesticada con centro de origen entre México y el norte de América del Sur, aunque ha sido introducida a zonas templadas y tropicales alrededor del mundo (Lim, 2013). Su crecimiento es óptimo en suelos franco-arenosos con un pH entre 6.5 y 7.5, requiere de temperaturas medias a cálidas y además es intolerante a la sombra (do Rêgo et al., 2016; Lim, 2013).

Taxonómicamente pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Solanales, familia Solanaceae, género *Capsicum* y especie *Capsicum annuum* L. (Bosland y Votava, 2012). Es una planta anual o perenne de corta duración. Morfológicamente es un sub-arbusto y alcanza hasta 1 m de altura, tiene una raíz principal profunda y sus tallos son glabrescentes. Sus hojas son simples y alternas de margen entero. Las flores tienen cáliz cupular, truncado; su corola es blanca; tiene cinco estambres; anteras azulosas y oblongas (Lim, 2013). Su fruto es una baya pungente elipsoidal-cónica o fusiforme y su pericarpio es verde, cuando está inmaduro, y rojo, cuando alcanza su madurez. Las semillas son amarillas con forma aplanada-lenticular (Lim, 2013).

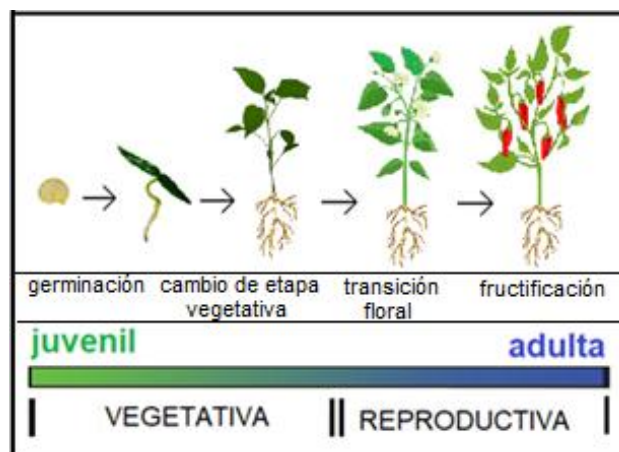
##### 3.1.1. Desarrollo fenológico de *Capsicum annuum* L.

El desarrollo de *C. annuum* está determinado por la interacción del genotipo de la planta con las condiciones ambientales, en el tiempo y el espacio (Rose, 2017). Estos procesos se traducen en la diferenciación de tejidos y órganos, mediante cambios anatómicos y morfológicos, así como cambios en el crecimiento mediante la variación de biomasa (Evans, 1973). Por lo tanto, el desarrollo de *C. annuum*

ocurre en las siguientes etapas (Bäurle y Dean, 2006; Bove et al., 2002; Cohen et al., 2014):

Germinación. Esta etapa se subdivide en tres fases siendo la primera la de imbibición donde la semilla se hidrata, reactivando su metabolismo, y para ello se genera un cambio en el proteoma del embrión (síntesis de proteínas *de novo*). En la segunda fase, el eje embrionario acumula sustancias osmóticamente activas y se acidifican las paredes celulares, lo cual permite, en la tercera fase, la expansión celular y la consecuente elongación del embrión, acción que es visible cuando la radícula protruye a través de la testa de la semilla (Figura 1).

- Desarrollo vegetativo juvenil (plántula). Etapa posterior al proceso de germinación y en la que empieza a crecer una pequeña plántula que puede conservar sus cotiledones y desarrolla hojas. Sin embargo, esta plántula es incapaz de inducir señales de floración (Figura 1).
- Desarrollo vegetativo adulto. En esta etapa, además de desarrollar hojas, yemas y ramificaciones, la planta adulta empieza a tener la capacidad de generar señales inductivas para la floración (Figura 1).
- Desarrollo reproductivo. Es la etapa en la que en la planta se generan procesos de meiosis, lo cual permite el desarrollo de estructuras sexuales (flores), que finalmente darán origen a frutos con semillas (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema que ilustra las etapas del desarrollo de *C. annuum* considerando la germinación de la semilla, transformación de la plántula juvenil a planta adulta, y su etapa reproductiva. [Adaptado de Bäurle y Dean, (2006)].

La duración de los procesos fenológicos en *C. annuum* (Figura 1) es variable, ya que dependen, en gran parte, de factores ambientales como: la temperatura, la humedad, la frecuencia de irrigación y el tipo de sustrato. En este sentido, se ha reportado que un cultivo establecido a una temperatura promedio de 23 °C y 298 mm de precipitación, las plantas fructifican a los seis meses de haber sido sembradas (Azofeifa y Moreira, 2004). El desarrollo del ciclo de vida de *C. annuum*, en el que se incluyen las etapas nombradas anteriormente (figura 1), requiere que las plantas tengan condiciones de nutrición óptimas.

### 3.2. Macronutrientes y micronutrientes

Las plantas no solamente necesitan agua y luz para desarrollarse, también requieren de nutrientes, los cuales se clasifican en dos grandes grupos, según su abundancia relativa en los tejidos vegetales (Marschner, 2011; Mengel y Kirby, 2000): Los macronutrientes (nitrógeno, N; fósforo, P; potasio, K; azufre, S; magnesio, Mg y calcio, Ca), que se encuentran por encima de 1000 mg Kg<sup>-1</sup> del peso seco de la planta, y los micronutrientes (hierro, Fe; manganeso, Mn; cobre, Cu; cinc, Zn; níquel, Ni; molibdeno, Mo; boro, B y cloro Cl) con concentraciones por debajo de 100 mg Kg<sup>-1</sup> del peso seco de la planta (Marschner, 2011; Mengel y Kirby, 2000). Tales elementos se aportan a los cultivos, generalmente, mediante el uso de productos químicos, denominados fertilizantes. El presente estudio se enfocó en establecer el efecto causado por el suministro del micronutriente Zn, como ZnO en dos tamaños de partícula diferente.

#### 3.2.1. El cinc (Zn) como micronutriente

El Zn es un elemento con peso atómico 65.38 u, y número atómico 30. Es un elemento esencial para la vida (Karlsson et al., 2015), Este elemento actúa como

cofactor de diferentes enzimas y por lo tanto es necesario para que las plantas realicen procesos como la fotosíntesis, la síntesis de las auxinas y la activación del sistema de defensa (Hafeez, 2013). Este micronutriente ayuda a mantener la homeóstasis ante condiciones de estrés, además es fundamental para la replicación y la transcripción del ADN (Hafeez, 2013; Stanton et al., 2022). Adicionalmente, el Zn hace parte estructural de las proteínas celulares, por lo cual ayuda a mantener la integridad de las membranas biológicas y afecta directamente la absorción de agua y minerales, ya que estabiliza algunas proteínas de transporte (Castillo-González et al., 2018). Este micronutriente también hace parte de los factores de transcripción, denominados proteínas dedo de cinc (en inglés, *Zinc finger proteins*), que están involucrados en la diferenciación celular, el desarrollo de semillas y demás órganos de las plantas (Singh et al., 2018; Sturikova et al., 2018; Yang et al., 2014).

El Zn en el suelo puede encontrarse como el catión soluble  $Zn^{2+}$ , forma en la cual está biodisponible para su absorción por la raíz de las plantas. El factor que más afecta la distribución y movilidad del Zn en el suelo es el pH, ya que su concentración aumenta cinco veces cada vez que el pH disminuye en una unidad. A pH mayor que 7.5, la disponibilidad del Zn en el suelo, para las plantas, se reduce debido a que el  $Zn(OH)_2$  insoluble predomina en la solución del suelo (Sturikova et al., 2018).

Por otro lado, se ha encontrado que el Zn es uno de los micronutrientes más deficitarios en los suelos de gran parte del planeta, condición que puede propiciar pérdidas en el rendimiento de los cultivos (Alloway, 2008). La deficiencia de Zn en las plantas, puede ocasionar hojas pequeñas y delgadas, con clorosis intervenal y disposición arrositada, características producidas debido al acortamiento de los entrenudos en el tallo (Balakrishnan, 1999; do Rêgo et al., 2016).

### 3.2.2. Toxicidad del cinc

No obstante, la exposición de las plantas a grandes cantidades de Zn puede generar fitotoxicidad. Se puede presentar toxicidad en las plantas, cuando hay exceso de Zn, porque los iones  $Zn^{2+}$  competirían por los sitios de iones biológicamente activos en las enzimas (Buchanan et al., 2015; Sturikova et al., 2018). De esta manera, el exceso de Zn podría afectar la transferencia de azúcares al embrión en las semillas, y disminuir el transporte y absorción de nutrientes y agua en las raíces, ya que este elemento compite de manera antagónica con otros como el N, Fe, Mn y Cu (Kaur y Garg, 2021). Además, este elemento, en altas concentraciones, puede reducir el crecimiento en diferentes órganos de las plantas e inhibir la multiplicación y diferenciación celular. Los efectos ocasionados por su toxicidad, también incluyen la desorganización del sistema fotosintético en los cloroplastos y respiratorio en las mitocondrias (Kaur y Garg, 2021; Sturikova et al., 2018).

Buscando soluciones que permitan tener un equilibrio de manera estable y prolongada en la liberación de iones  $Zn^{2+}$ , sin generar un impacto desfavorable sobre las plantas o el medio ambiente, se han propuesto estrategias de empleo eficiente de fertilizantes haciendo uso de la nanotecnología (Thounaojam et al., 2021).

### 3.3. La nanotecnología y los nanomateriales

La nanotecnología es un campo de estudio que busca obtener, evaluar y manipular de manera controlada materiales, estructuras, dispositivos y sistemas a escala nanométrica, concretamente con un tamaño menor a 100 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). Este interés surge porque, a esta escala, la materia presenta características y propiedades físicas, químicas y biológicas novedosas (Ealias y Saravanakumar, 2017; Roco, 2011). Específicamente, dentro de la nanotecnología, se consideran

los nanomateriales, que pueden tener forma de puntos cuánticos, nanopartículas, nano-cables, nano-hojas, entre otros (Nasrollahzadeh et al., 2019). En este estudio se utilizaron nanopartículas.

### 3.3.1. Las nanopartículas

Las nanopartículas son partículas muy pequeñas con una distribución de tamaño en el rango de nanómetros (Martino et al., 2016). Las nanopartículas se caracterizan por poseer una alta superficie específica (área superficial por unidad de masa) o sea una alta cantidad de centros activos, esto debido a que la cantidad de iones, átomos y moléculas en su superficie es grande frente al número total de estas especies químicas en la partícula. Esta característica las hace más reactivas que las partículas de composición similar y mayor tamaño (Martino et al., 2016; Mohamed y Paleologos, 2018). Debido a su composición, las nanopartículas inorgánicas, conformadas por metales o por óxidos metálicos, pueden tener aplicaciones potenciales en el campo de la nutrición mineral de las plantas (Chhipa, 2017; Ealias y Saravanakumar, 2017). Entre ellas se destacan las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs) que son empleadas en el área de la salud, los materiales, las ciencias ambientales, y, específicamente, en la agricultura para la producción de agroquímicos (Mosquera-Sánchez et al., 2020; Ong et al., 2018; Rajput et al., 2020b; Scott et al., 2018; Vargas et al., 2021). Uno de los métodos utilizados para obtener estas nanopartículas es el denominado complejo polimérico-Pechini, proceso utilizado en este trabajo para obtener las ZnO-NPs requeridas.

### 3.3.2. Método de síntesis de ZnO-NPs mediante el complejo polimérico – Pechini

Este método fue patentado en 1967 con el objetivo de obtener titanatos o niobatos de plomo o alcalinotérreos (Pechini, 1967). Sin embargo, el proceso original ha sufrido modificaciones que han permitido obtener óxidos metálicos de tamaño

nanométrico (Sunde et al., 2016). En el proceso modificado se utiliza un precursor de sal de cinc, un ácido orgánico, como el ácido cítrico, etilenglicol e hidróxido de amonio (Ochoa et al., 2009) que propician procesos de quelación, así como reacciones de poliesterificación e hidrólisis y condensación, favoreciendo la formación de una resina que, al ser pirolizada, permite obtener las ZnO-NPs de interés (Azor, 2018; Ochoa et al., 2009). Para verificar la naturaleza química y características de estas nanopartículas, posteriormente, se utilizaron diversas técnicas convencionales de caracterización.

### 3.3.3. Técnicas de caracterización de nanopartículas

Debido a que el efecto de las nanopartículas en los sistemas biológicos depende de sus características es necesario conocer las propiedades de los materiales nanométricos obtenidos, usando el proceso de síntesis seleccionado. Para ello se utilizan varias técnicas de caracterización (Kumar y Dixit, 2017), entre las que se encuentran las que se indican a continuación.

- Análisis termogravimétrico (ATG) y análisis térmico diferencial (ATD)

Con el ATG se determina la estabilidad térmica de una muestra y la fracción de sus componentes volátiles, mediante el cambio de su masa, al someterla a un calentamiento a una tasa de temperatura constante (Rajisha et al., 2011). Por otro lado, en el ATD se compara el cambio de temperatura entre la muestra de interés y una muestra patrón de referencia, bajo condiciones similares de calentamiento o enfriamiento (Tanzi et al., 2019), cambios de temperatura que indicarían el desarrollo de procesos exotérmicos o endotérmicos al interior del sólido. Los resultados de estos ensayos permiten establecer el rango de temperatura óptimo para tratar una muestra, y obtener el producto requerido, en el presente estudio un óxido.

- Espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV – Vis)

Esta técnica se utiliza para conocer las transiciones electrónicas más importantes, que ocurren en el sólido sintetizado, al hacer incidir radiación electromagnética, sobre él. Dichas transiciones se pueden determinar debido a que la radiación incidente sobre el material, en el rango de las longitudes de onda UV-Vis, suministraría a un electrón del sólido la cantidad mínima de energía para excitarlo. Así, por ejemplo, el electrón podría pasar de la parte superior de la banda de valencia a la parte inferior de la banda de conducción y con este valor de energía se puede determinar el “*gap*” de energía del material (Yurdakal et al., 2019).

- Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)

Esta técnica permite determinar los grupos funcionales presentes en una muestra y se fundamenta en la irradiación de la muestra con longitudes de onda en el espectro infrarrojo, radiación que puede ser reflejada o transmitida por el sólido dependiendo de la frecuencia y su correlación con la frecuencia de vibración propia de los grupos funcionales existentes, lo que puede propiciar un fenómeno de resonancia. De esta manera, los enlaces presentes en la muestra pueden absorber radiación de frecuencias específicas y vibrar de manera distintiva, dependiendo de la naturaleza del grupo funcional. Posteriormente, con la obtención del espectro se pueden identificar los diferentes enlaces o grupos funcionales mediante la comparación con espectros IR conocidos, recopilados en bases de datos (Kristo, 2012).

- Difracción de rayos X (DRX)

Esta técnica permite determinar la estructura cristalina de un sólido. La misma se fundamenta en la dispersión e interferencia de un haz de rayos X monocromático que incide, en ángulos específicos, sobre los planos reticulares de una muestra. Este proceso permite determinar su ordenamiento cristalino mediante la



generación de picos de interferencia constructiva, los que dan origen al difractograma de la muestra. La intensidad de estos picos está relacionada con la disposición y los arreglos periódicos de los átomos constituyentes y es típica para cada material, por lo que se puede comparar con los patrones estándar almacenados en bases de datos (Kohli y Mittal, 2019).

- Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Esta técnica permite conocer la morfología, tamaño y aglomeración de las nanopartículas y se basa en el escaneo de la superficie de una muestra con una sonda constituida por un haz de electrones, los cuales producen una emisión de electrones secundarios desde la muestra, lo que permite la formación una imagen del sólido (Henini, 2000).

#### 3.4. Las ZnO-NPs y su interacción con las plantas

La exposición de plantas a ZnO-NPs puede realizarse a través de las semillas, raíces o parte aérea y según la vía, los mecanismos de absorción y transporte cambian (Barkataki y Singh, 2019). El transporte de ZnO-NPs desde la raíz de las plantas puede ocurrir mediante el espacio apoplástico, constituido por los espacios intercelulares, o mediante el espacio simplástico, por el que se transportan sustancias de célula a célula mediante los plasmodesmos que las unen (Faizan et al., 2020; Marschner, 2011).

La ruta apoplástica permite a las nanopartículas transportarse hasta el xilema y moverse con la corriente transpiratoria. El ingreso de nanopartículas a la raíz, mediante esta ruta, depende del tamaño de poro de las paredes celulares (5-20 nm), la presión osmótica, las fuerzas capilares y la capacidad de las nanopartículas para atravesar la banda de Caspary (Barkataki y Singh, 2019).

En cuanto a la ruta simplástica, la entrada de las nanopartículas depende de la endocitosis, que posiblemente, permite su encapsulación e ingreso a las células (Barkataki y Singh, 2019; Singh et al., 2018), y del tamaño de los plasmodesmos (20 a 50 nm de diámetro). Esta ruta permite el transporte hacia el floema de la planta o el almacenamiento y transformación de las nanopartículas en las vacuolas de las células (Barkataki y Singh, 2019; Singh et al., 2018).

Adicionalmente, el efecto de las ZnO-NPs depende de factores asociados a las plantas, el sustrato, así como de sus características fisicoquímicas, de modo que estos factores interactúan para propiciar efectos benéficos o tóxicos en las plantas. A continuación se realiza una breve descripción de estos efectos.

#### 3.4.1. Efectos benéficos

Las nanopartículas pueden liberar iones  $Zn^{2+}$ , de manera controlada, y por lo tanto la fertilización puede realizarse de forma más eficaz (Sturikova et al., 2018). Por otro lado, la adición de ZnO-NPs podría reducir algunos tipos de estrés en las plantas, como el estrés salino o por metales pesados (Abdel Latef et al., 2017; Rizwan et al., 2019) y puede promover la germinación y el crecimiento en algunas especies de plantas (Prasad et al., 2012; Raja et al., 2019).

#### 3.4.2. Efectos tóxicos

Las nanopartículas pueden causar daños mecánicos en las plantas al obstruir el sistema de transporte, la pared o membrana celular y pueden ocasionar necrosis en los tejidos (García-Gómez et al., 2018b). Otro mecanismo de daño celular ocurre cuando las nanopartículas generan estrés oxidativo, al interactuar con los componentes celulares, produciendo especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Molnár et al., 2020). Este estrés puede afectar los procesos de multiplicación y

aumento de volumen celular, lo que ocasionaría, finalmente, la disminución del crecimiento de la planta (Rajput et al., 2020a).

#### 4. ANTECEDENTES

Actualmente, investigaciones sobre nanopartículas se han enfocado en determinar el destino de las mismas, las modificaciones que sufren, su transferencia a las cadenas tróficas, así como su uso como nutriente (Zeb et al., 2021). Específicamente, se ha encontrado que la exposición de plantas a ZnO-NPs ha ocasionado efectos tanto benéficos como perjudiciales (García-Gómez y Fernández, 2019).

La bibliografía consultada indicó que la exposición a ZnO-NPs, en la etapa de desarrollo juvenil, aumentó el porcentaje de germinación en *Triticum aestivum* (Rai-Kalal y Jajoo, 2021), *Allium cepa* (Tymoszuk y Wojnarowicz, 2020) y *Zea mays* (Neto et al., 2020). Asimismo se encontró que, en esta etapa, las ZnO-NPs podrían favorecer el crecimiento de la raíz y el tallo de las plántulas, promoviendo, adicionalmente, el aumento de la biomasa en especies como *Capsicum chinense* (Israel García-López et al., 2018), *Phaseolus vulgaris* (Savassa et al., 2018) y *Solanum melongena* (Younes et al., 2020). Por el contrario, en otros trabajos, se encontró que la exposición a las ZnO-NPs resultaba ser perjudicial, reduciéndose el porcentaje de germinación, la longitud de la raíz o la biomasa en *Arabidopsis thaliana* (Wan et al., 2019), *Trigonella foenum-graecum* (Osman et al., 2020) y *Brassica nigra* (Zafar et al., 2019).

Cuando las plantas se encontraban en la etapa adulta, las investigaciones indicaron que las ZnO-NPs promovían el crecimiento del tallo y raíz, y favorecían

el aumento del área foliar y la acumulación de biomasa en algunas especies como: *Brassica oleracea*, (Awan et al., 2021), *Lactuca sativa* (Xu et al., 2018) y *Oryza sativa* (Madhusudanan et al., 2019). Sin embargo, otras plantas mostraron intolerancia a la exposición a las ZnO-NPs y en respuesta su crecimiento y biomasa se redujeron, como es el caso de *Cucumis sativus* (Moghaddasi et al., 2017), *Glycine max* (Priester et al., 2017) y *Raphanus sativus* (Singh y Kumar, 2018).

Por otro lado, si se compara el efecto de las ZnO-NPs con el de las ZnO-MPs, los resultados reportados son contradictorios. Algunos investigadores indican que las nanopartículas tienen un efecto similar en las plantas que las micropartículas (García-Gómez et al., 2018a), mientras que otros mencionan que el efecto de las nanopartículas resulta ser más perjudicial, esto debido a que ellas presentan una forma más biodisponible para las plantas (Moghaddasi et al., 2017). Sin embargo, también, se ha encontrado que las nanopartículas pueden ser menos perjudiciales para las plantas, ya que tanto las condiciones del sustrato, como la especie de planta pueden modular la biodisponibilidad del Zn, dependiendo del tamaño de partícula (García-Gómez y Fernández, 2019; Medina-Velo et al., 2017). Adicionalmente, otros autores han reportado que las nanopartículas pueden ser más fácilmente absorbidas que las micropartículas, por la raíz, cuando se presenta un déficit de cinc, lo que se traduce en efectos benéficos (Kopittke et al., 2019).

Específicamente, los estudios realizados en *C. annuum*, mostraron que la exposición de semillas a ZnO-NPs, en una concentración entre 100 y 500 mg L<sup>-1</sup>, aumentaron su vigor, aunque la longitud de la raíz disminuyó (García-López et al., 2018). Otros efectos negativos encontrados están relacionados con la disminución de biomasa y área foliar (Iranbakhsh et al., 2018). Sin embargo, cuando la vía de aplicación fue la foliar, en una concentración de 50 mg L<sup>-1</sup>, se favoreció el crecimiento tanto del tallo y la raíz, así como del área foliar y se incrementó el peso seco (Méndez-Argüello et al., 2016).

Si se consideran los diversos mecanismos de suministro de las ZnO-NPs a las plantas, aún se desconoce el efecto que puede tener su aplicación sobre *C. annuum*, en diferentes concentraciones, por la vía radicular. Por lo tanto, es de interés evaluar el efecto de las nanopartículas al utilizar diversas rutas de exposición, información que permitiría la implementación segura y eficaz de la nanotecnología a la agricultura.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar de manera coherente el proyecto y en consideración de su naturaleza interdisciplinaria, el trabajo se realizó en tres etapas:

- Síntesis, caracterización de ZnO-NPs y adquisición de micropartículas de ZnO.
- Determinación del efecto de nanopartículas y micropartículas de ZnO sobre la germinación de semillas de *C. annuum* y su desarrollo vegetativo juvenil (etapa de plántula).
- Determinación del efecto de nanopartículas y micropartículas de ZnO adicionadas al sustrato sobre el desarrollo vegetativo adulto de *C. annuum*.

### 5.1. Síntesis de ZnO-NPs

Las ZnO-NPs se sintetizaron mediante el método de complejo polimérico - Pechini (Pechini, 1967), modificado para favorecer reacciones de hidrólisis y condensación. Para ello se utilizó como precursor el acetato de cinc dihidratado ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - Merck), ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  - Merck) como agente quelante y etilenglicol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  - Merck) como solvente, en una proporción molar de 1/1/4 respectivamente.

Para iniciar la síntesis, se calentó el etilenglicol a 70 °C agitándolo constantemente a 320 rpm mientras se adicionaba el ácido cítrico correspondiente. Simultáneamente, en otro recipiente, se disolvió el acetato de cinc en 40 mL de agua destilada - desionizada. Luego se mezclaron estas dos disoluciones a temperatura ambiente, con agitación constante. A la mezcla resultante se ajustó su pH a 8.5, adicionándole hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH 28.81% Merck) con un dosificador volumétrico (Metrohm). Mientras se adicionaba el hidróxido de amonio al sistema, se registró la curva de valoración potenciométrica (gráfica del pH del sistema en función del volumen suministrado de hidróxido de amonio), esto con el objetivo de controlar las condiciones del proceso de síntesis y garantizar la reproducibilidad del mismo.

La mezcla a pH de 8.5 se calentó, a 120 °C, hasta que se conformó una resina de color amarillo. Posteriormente, esta resina se sometió por 3 horas a tratamiento térmico de 350 °C en un horno (Haceb), obteniéndose un precalcinado de color negro, el cual se maceró en un mortero de ágata. Finalmente, el precalcinado se trasladó a una mufla (Terrígeno), la cual se programó para que siguiera una curva de calentamiento, a una velocidad de 5 °C min<sup>-1</sup> y que duró 9 horas, hasta alcanzar una temperatura de 500 °C. El sólido resultante de este tratamiento fue un polvo calcinado de color blanco.

## 5.2. Caracterización del material pulverulento

Para determinar la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas del sólido obtenido mediante síntesis descrita, se emplearon las siguientes técnicas convencionales de caracterización de sustancias:

### 5.2.1. Análisis termogravimétrico (ATG) y análisis térmico diferencial (ATD)

Para determinar el efecto del tratamiento térmico sobre el precalcinado y conocer los eventos fisicoquímicos que pueden ocurrir durante su desarrollo, el precalcinado se sometió a un análisis térmico. Para ello se empleó el equipo termogravimétrico – termodiferencial SDT Q600 - TA Instruments, a una velocidad de calentamiento de  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  en una atmósfera de aire.

### 5.2.2. Espectroscopía de absorción en ultravioleta-visible (UV-Vis)

Las muestras sintetizadas se caracterizaron empleando espectroscopía de absorción en el rango UV-Vis para determinar las transiciones electrónicas más importantes que podrían ocurrir al interior del sólido. Para ello se preparó una suspensión acuosa con el polvo sintetizado, a una concentración de  $100\text{ mg L}^{-1}$ , la cual se sometió a ultrasonido, durante 30 minutos, para romper los aglomerados existentes. Posteriormente, la suspensión se transfirió a una celda de cuarzo, de 1 cm de ancho, la cual se colocó en el porta-muestra del espectrofotómetro (Thermo Scientific Spectronic Genesys 6). Para obtener el espectro de absorción UV-Vis de la muestra, se realizó una estimación entre 190 nm y 800 nm de longitud de onda.

### 5.2.3. Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)

Por otro lado, para conocer los grupos funcionales presentes en el material sintetizado, se empleó espectroscopía infrarroja (IR). Para obtener el espectro IR de la muestra de interés, se conformó una pastilla mezclando el sólido sintetizado y KBr en un porcentaje aproximado de 10 y 90% (p/p), respectivamente. Esta pastilla se colocó en el porta-muestra del espectrofotómetro (Thermo Scientific Nicolet iS 10) y se realizó un barrido entre  $400\text{ y }4000\text{ cm}^{-1}$ .

#### 5.2.4. Difracción de rayos X (DRX)

Adicionalmente, para conocer la estructura cristalina del polvo cerámico sintetizado se empleó difracción de rayos X (DRX). Para obtener el difractograma de la muestra sintetizada por el método de Pechini (1967) modificado, se empleó el difractómetro D8 ADVANCE, con Geometría Da Vinci.

#### 5.2.5. Microscopía electrónica de barrido

Finalmente, se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB) para conocer la aglomeración, el tamaño y la morfología de las partículas de ZnO sintetizadas. Para generar una superficie conductora y evitar que la muestra se cargara eléctricamente, el polvo cerámico se adhirió a una cinta de carbono y se realizó un metalizado superficial con oro, usando para ello un equipo de pulverización catódica (Denton Vacuum Modelo Desk IV). Posteriormente, este montaje del sólido de interés se colocó en el porta-muestra del equipo y se observó con un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM 6490 LV), en el modo configuración de electrones secundarios, con un voltaje de aceleración de 20 kV.

#### 5.3. Adquisición de micropartículas de ZnO

En este trabajo se utilizó, como micropartículas de ZnO, el óxido adquirido en la forma comercial (Sigma-Aldrich), con 99.9% de pureza y tamaño de partícula <1  $\mu\text{m}$  (información suministrada por el fabricante).

#### 5.4. Obtención y desinfección del material vegetal



Para la realización de este trabajo se emplearon semillas de ají jalapeño (*Capsicum annuum* L.), extraídas de frutos adquiridos directamente con un agricultor y producidos orgánicamente, lo que garantizó que no habían sido expuestas a agroquímicos convencionales, que pudieran interferir con el efecto de los tratamientos experimentales con ZnO a que fueron sometidas (OECD, 2006). Estos frutos se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 2.5%, se lavaron con agua destilada y se dejaron madurar al ambiente hasta que adquirieron un color rojo. Luego se extrajeron las semillas de los frutos y aquellas que no presentaban deterioro fueron depositadas en recipientes de vidrio color ámbar y almacenadas en oscuridad a 5 °C (Khan et al., 2009). Antes de someter las semillas a los tratamientos, estas se desinfectaron mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 2%, durante 5 minutos, con agitación permanente, seguida de tres (3) enjuagues con agua destilada estéril (Ahmed et al., 2000).

#### 5.5. Selección de tratamientos

La determinación del efecto de las nanopartículas y las micropartículas de ZnO, sobre la germinación de semillas y el desarrollo vegetativo de plantas de *C. annuum*, se efectuó exponiendo semillas o plántulas a tratamientos con ZnO. Para ello, se consideraron los dos tamaños de partícula y diferentes concentraciones, condiciones seleccionadas de acuerdo a la clasificación establecida por Reddy-Pullagurala et al. (2018), para concentraciones ambientalmente relevantes de ZnO-NPs:

- Las dosis bajas se encuentran entre 0 y 50 mg Kg<sup>-1</sup>, como se ha reportado, y en general, tendrían efectos benéficos para las plantas.
- Las dosis medias se encontrarían en el rango de concentraciones entre 50 y 500 mg Kg<sup>-1</sup>.
- Las dosis altas estarían por encima de los 500 mg Kg<sup>-1</sup>, para las cuales se han reportado efectos de toxicidad en las plantas. Sin embargo, rara vez los ecosistemas terrestres contienen concentraciones tan altas de ZnO-NPs.

De acuerdo a lo expuesto, se decidió emplear tres (3) concentraciones bajas (10, 20 y 50 mg L<sup>-1</sup> ó mg Kg<sup>-1</sup>) y dos (2) concentraciones medias (100 y 200 mg L<sup>-1</sup> ó mg Kg<sup>-1</sup>), tanto de ZnO-NPs como de ZnO-MPs, y se incluyó como testigo absoluto un tratamiento consistente en semillas con agua destilada o plantas con sustrato.

## 5.6. Efecto del óxido de cinc (ZnO) sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *C. annuum*

### 5.6.1. Efecto del ZnO sobre la germinación de semillas

El experimento realizado para determinar el efecto del ZnO sobre la germinación de semillas de *C. annuum*, se llevó a cabo en los laboratorios adscritos al Departamento de Biología de la Universidad del Cauca. Con este propósito 100 semillas previamente desinfectadas, fueron colocadas durante 24 horas en suspensiones acuosas de ZnO, constituido por nano o micropartículas, en las concentraciones ya indicadas y ajustadas a un pH de 7.0. Luego las semillas se distribuyeron en 10 cajas de Petri esterilizadas (repeticiones), cada una con 10 semillas (unidad experimental), provistas con papel filtro (Chmlab) y 5 mL de agua desionizada (Raliya et al., 2015). Estas cajas se ubicaron en un cuarto de crecimiento, con fotoperiodo de 12 horas (Nieto-Garibay et al., 2009), iluminación de 2000 lux y temperatura de  $24.2 \pm 6$  °C.

### 5.6.2. Variable estimada

La variable de respuesta estimada, en las semillas expuestas a los tratamientos, fue el número de semillas germinadas a los 7 y 14 días (ISTA, 2016). Las semillas se clasificaron como germinadas considerando el surgimiento de una radícula con al menos 1 mm de longitud (Lee et al., 2018).

### 5.6.3. Efecto del ZnO sobre el crecimiento de plántulas de *C. annuum*

El efecto del ZnO sobre el desarrollo juvenil de *C. annuum*, se determinó en las plántulas provenientes de las semillas expuestas a este óxido en el ensayo previamente realizado y descrito, cuantificando 14 días después de la exposición (dde) a los tratamientos, evaluando las siguientes variables: la longitud del tallo, longitud de la raíz principal, el peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz de plántulas.

Para realizar este procedimiento, se separó la raíz del tallo de las plántulas mediante un corte en la zona de transición raíz/tallo y su longitud se midió, para cada plántula, con un calibrador digital (Fischer). El peso se determinó empleando una balanza analítica (Ohaus Adventurer) y, debido a que la balanza no poseía las suficientes cifras significativas para determinar pesos individuales, este se estimó para el conjunto de plántulas que había en una caja de Petri. Para cuantificar el peso seco, inicialmente las muestras se colocaron en un horno (Wtc Binder) a 80 °C, hasta alcanzar un peso constante, el cual fue el que se registró (Smart y Bingham, 1974).

### 5.7. Determinación del efecto de partículas ZnO adicionadas al sustrato sobre el desarrollo vegetativo adulto de plantas de *C. annuum*

Para evaluar el efecto de las nanopartículas y las micropartículas de ZnO, sobre el desarrollo vegetativo adulto de *C. annuum*, se sembraron en sustrato las plántulas obtenidas a partir de semillas.

### 5.7.1. Preparación del sustrato y constitución de los tratamientos

El sustrato empleado se conformó preparando una mezcla con turba de *Sphagnum* spp. (Kekilä), perlita (Hoffman) y zeolita (Bioespacio), en proporción de volumen 50/30/20 respectivamente (Méndez-Argüello et al., 2016). Esta mezcla se dividió en 11 porciones, adicionándose a cada una 10, 20, 50, 100 ó 200 mg de nanopartículas o micropartículas de ZnO, por Kg de sustrato; a una de ellas no se le adicionó ZnO, constituyéndose en el testigo absoluto; de esta manera se conformaron los tratamientos. Cada porción de sustrato se llevó a un molino rotatorio, donde se mezcló durante una hora, para garantizar su homogeneidad. Posteriormente, de esta mezcla se tomaron porciones de 360 g y se dispensaron en 10 macetas de plástico, de 10 cm de diámetro y 12 cm de altura, debidamente etiquetadas con la identidad de los tratamientos. Para determinar el pH del sustrato, se adicionó agua destilada en proporción 1/1 (p/v), se mezcló regularmente y, después de una hora, se realizó la determinación de pH con un pH-metro (Metrohm), obteniéndose un pH de 6.50 (Bravo y Giraldo, 2003).

### 5.7.2. Obtención de plántulas

Esta etapa se desarrolló, en los laboratorios de Biología de la Universidad del Cauca. Para ello se tomaron 1000 semillas de *C. annuum* y se depositaron en 100 cajas de Petri (10 semillas por caja), provistas de papel filtro (Chmlab), humedecido con 5 mL de agua desionizada. Estas cajas se ubicaron en un cuarto de crecimiento, con 12 horas de fotoperíodo (Nieto-Garibay et al., 2009), iluminación de 2000 lux y a temperatura promedio de  $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante 14 días. En estas condiciones germinaron las semillas que dieron origen a las plántulas que se evaluaron.

### 5.7.3. Establecimiento de plántulas en el sustrato

En cada maceta provista con el sustrato, se sembró tres (3) plántulas, con apariencia saludable y una longitud de  $5 \pm 0.5$  cm, las cuales fueron irrigadas con 200 mL de agua destilada por maceta. Posteriormente, las macetas se trasladaron a un invernadero, a una temperatura promedio de  $25 \pm 7$  °C y humedad relativa promedio de  $68 \pm 6\%$ , donde estas se ubicaron completamente al azar. Cada siete (7) días se realizó una redistribución espacial de las macetas, completamente aleatoria, y a cada maceta se le adicionó 100 mL de solución de Hoagland (Phytotech), elaborada según Hoagland y Arnon (1950). Transcurridos 63 días, se efectuó un raleo dejando una plántula por maceta para evitar relaciones de competencia o alelopatía (Geilfus, 2019). Este experimento tuvo una duración total de 126 días.

### 5.7.4. Variables estimadas

En este experimento donde se evaluó el desarrollo vegetativo adulto de plantas de *C. annuum*, después de ser tratadas con ZnO, se tomaron como variables el número de hojas y número de yemas florales, las cuales fueron determinadas por observación directa. Además, se evaluó la longitud del tallo y longitud de la raíz principal, empleando para ello una regla graduada en centímetros (Liu y Lal, 2014); el área foliar que se determinó con un medidor de área foliar LICOR LI-3100 (Azofeifa y Moreira, 2004); el peso seco tanto de la parte aérea como de la raíz y que fueron cuantificados mediante una balanza analítica Ohaus Adventurer. Específicamente, para determinar el peso seco, las muestras se colocaron en bolsas de papel etiquetadas y se secaron en un horno (Wtc Binder) a 80 °C, hasta alcanzar un peso constante (Smart y Bingham, 1974).

## 5.8. Diseño experimental y análisis estadístico

Las unidades experimentales, del primer y segundo experimento, correspondieron al conjunto de 10 semillas establecidas en las cajas de Petri y a las plantas sembradas en sustrato, que respectivamente, se asignaron a los tratamientos mediante un diseño experimental completamente al azar. De manera específica, los valores correspondientes al número de semillas germinadas se analizaron mediante un modelo lineal generalizado mixto con medidas repetidas. La expresión de los modelos lineal generalizado y lineal generalizado mixto correspondió a la consignada en Gómez et al., (2019) y Landy N., (2012). El análisis de los datos para las variables indicadas se efectuó atendiendo a su distribución y cumplimiento de los requerimientos para el mismo, tal como se resume en la Tabla 1, construida con base en este criterio.

El análisis estadístico de todos los datos provenientes de las variables (ver Tabla 1), se realizó empleando el programa estadístico InfoStat v. 2020 (Di Rienzo et al., 2020), que utiliza el motor de cálculo de R (Wilson y Norden, 2015). Las gráficas se obtuvieron usando el programa IBM SPSS Statistics v.23 (IBM, 2019) y Origin (Origin, 2020).

**Tabla 1.** Análisis estadístico para las variables estimadas en *C. annuum* sometido a tratamientos con diferentes concentraciones de ZnO-NPs o ZnO-MPs.

Experimento	Tipo de variables	Descripción de variables	Distribución	Análisis	Separación de medias
Desarrollo vegetativo juvenil	Discretas	NSG 7-14	binomial	MLGM	Bonferroni
	Continuas	LR	gamma	MLG	DGC
		LT	gamma	MLG	DGC
		PSR	normal	MLG	DGC
		PSA	gamma	MLG	DGC
		LR x PSR		$\tau$ Kendall	
		LT x PST		$\tau$ Kendall	
Desarrollo vegetativo adulto	Discretas	NH	cuasi-Poisson	MLG	Bonferroni
		NYF	Poisson	MLG	Bonferroni
		AF	gamma	MLG	Bonferroni
	Continuas	LR	gamma	MLG	Bonferroni
		LT	gamma	MLG	Bonferroni

		PSR	gamma	MLG	Bonferroni
		PSA	gamma	MLG	Bonferroni
		LR x PSR		r Pearson	
		LT x PSA		r Pearson	

[**Abreviaturas para variables:** NSG 7-14, número de semillas germinadas a los 7 y 14 dde; LR, longitud de la raíz; LT, longitud del tallo; PSR, peso seco de la raíz; PSA, peso seco de la parte aérea; NH, número de hojas; NYF, número de yemas florales; AF, área foliar. **Análisis:** LR x PSR, correlación entre longitud de la raíz y su peso seco; LT x PSA, correlación entre la longitud del tallo y el peso seco de la parte aérea; MLG, modelo lineal generalizado; MLGM, modelo lineal generalizado mixto;  $\tau$  Kendall, Correlación de Kendall; r Pearson, Correlación de Pearson. **Separación de medias:** DGC, Prueba Di renzo, Guzmán y Casanoves. Las pruebas de análisis de varianza, los modelos empleados y la separación de medias se aplicaron con  $p \leq 0.05$ ].

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Síntesis de ZnO-NPs

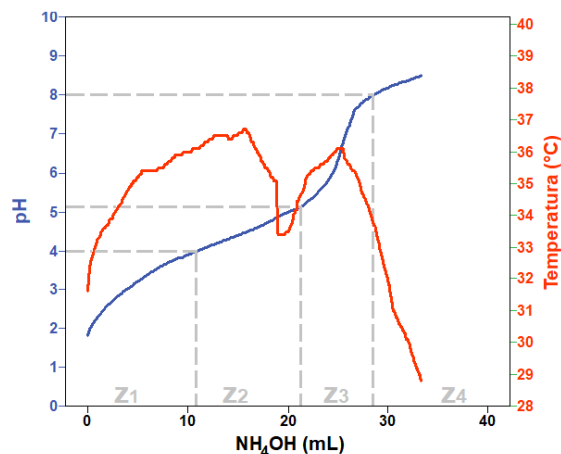
En la Figura 2 se muestra la curva de valoración potenciométrica de la mezcla acetato de cinc – etilenglicol – ácido cítrico, así como la variación de temperatura, obtenidas al adicionar hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$  - Merck) al sistema, durante la realización del proceso propuesto por Pechini, (1967) y modificado. Si se considera el cambio de pendiente, en la curva de valoración, son evidentes cuatro etapas, tal como se indica en la Figura 2. Inicialmente, entre pH 1.82 y 4.0, el sistema que contenía el precursor de cinc presentó un aspecto de color blanco y viscoso que, al adicionarle lentamente el hidróxido de amonio, incrementó su valor del pH así como el de su temperatura, alcanzando un valor de  $\sim 36$  °C. Este comportamiento de la temperatura del sistema indicaría que, por la adición del  $\text{NH}_4\text{OH}$ , ocurrirían reacciones exotérmicas en su interior.

En la segunda etapa del proceso, cuando el valor de pH presentó valores entre 4.1 y 5.0, el sistema mostró un cambio de color y poco a poco se fue tornando transparente. En esta etapa, se presentó un incremento aproximadamente lineal de la curva de valoración, con un valor de pendiente constante, lo que indicaría un consumo moderado, continuo y regular de los hidroxilos – OH<sup>-</sup> suministrados por la base. Estos hidroxilos reaccionarían con las especies químicas presentes en el sistema favoreciendo, por ejemplo, reacciones de hidrólisis y condensación (Farhadi-Khouzani et al., 2012). Aunque al inicio de la segunda etapa, la temperatura del sistema alcanzó un valor máximo de 36.7 °C, al final de la misma la temperatura se redujo hasta 33.4 °C, lo que indicaría el desarrollo de reacciones endotérmicas en esta etapa del proceso.

En la tercera etapa, cuando el sistema pasó de tener un pH de 5.2 a un valor de 8.0, la mezcla se volvió a tornar de color blanco. En esta etapa del proceso, el pH se incrementó considerablemente, lo cual indica que pocos hidroxilos reaccionaron con las especies químicas presentes en el sistema, propiciando un gran aumento de la concentración de OH<sup>-</sup> en el solvente y por lo tanto el rápido incremento del valor del pH que se observa en esta zona de la curva (Figura 2). Además se presentó nuevamente un incremento en el valor de temperatura del sistema, alcanzando un valor máximo de ~36.2 °C, indicando el desarrollo de reacciones exotérmicas en su interior.

Al alcanzar un valor de pH entre 8.0 y 8.5, el sistema se tornó, nuevamente, transparente y se saturó (cuarta etapa), es decir que la adición de hidróxido de amonio incrementó el pH de manera lenta y constante. Respecto a la temperatura, esta fue disminuyendo hasta alcanzar aproximadamente la temperatura ambiente. Considerando el comportamiento de la curva de valoración potenciométrica (Figura 2), se definió como pH adecuado para la síntesis 8.5.





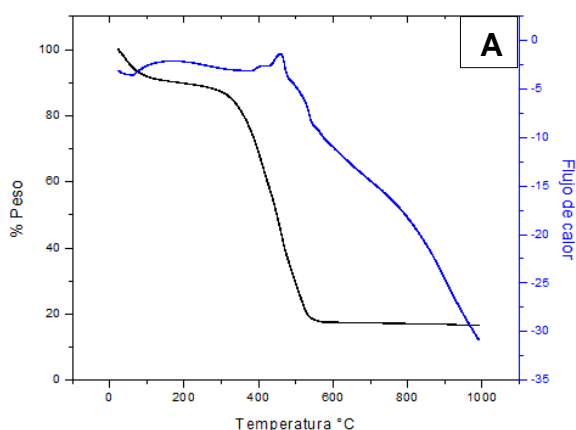
**Figura 2.** Curva de valoración potenciométrica (color azul) y curva de variación de la temperatura (color rojo) obtenidas para el sistema de cinc durante la síntesis de ZnO-NPs, utilizando el método de Pechini, (1967) modificado. [La gráfica se ha dividido en diferentes zonas (Z) con base en los cambios observados durante el proceso de síntesis].

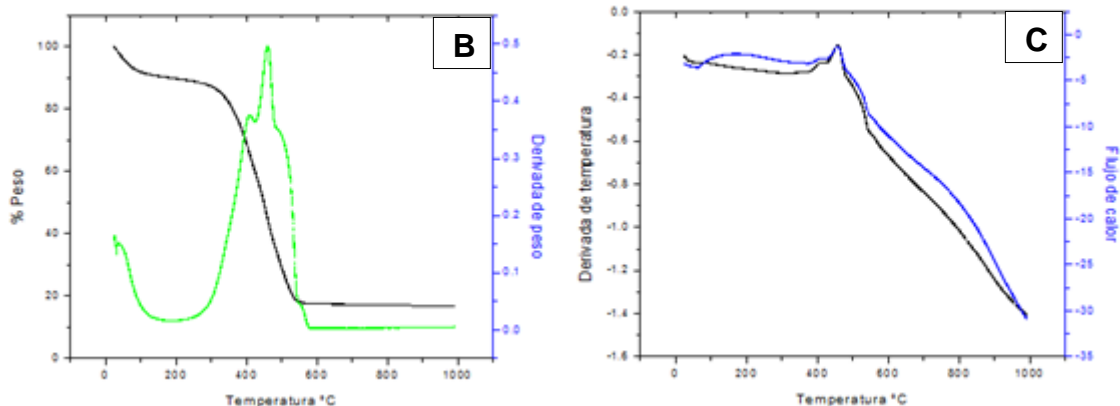
## 6.2. Caracterización del material cerámico sintetizado

### 6.2.1. Análisis térmogravimétrico (ATG) y análisis térmico diferencial (ATD)

En la figura 3 se muestran las curvas ATG/ATD y sus derivadas, correspondientes al pre-calcinado del compuesto de cinc, sintetizado por el método de complejo polimérico – Pechini. Analizando la curva de pérdida de peso (curva de ATG - Figura 3A y 3B), se observa que el sólido de interés, al calentarse hasta la temperatura de 100 °C, experimenta una pérdida de peso de ~10% que puede atribuirse a la volatilización del agua adsorbida en la superficie del material. La mayor pérdida de peso se presentó entre ~340 y ~520 °C, aproximadamente de un 65%, y que se puede asociar a la descomposición total de los complejos existentes en el sólido, principalmente a la oxidación de la fase orgánica presente ocasionando el desprendimiento de CO<sub>2</sub> y agua. En este rango de temperaturas se formaría el óxido de cinc. Finalmente, a partir de los ~550 °C, la muestra adquirió peso constante.

En el caso de la curva de flujo de calor (curva de ATD – Figuras 3A y 3C), inicialmente, a una temperatura de 90 °C, se observa un pico endotérmico pequeño, que se podría asociar con la volatilización del agua adsorbida. Posteriormente, a partir de los ~400 °C, se presentan en la curva varios picos exotérmicos pequeños consecutivos, destacándose el ubicado a ~480 °C y que correspondería a la oxidación de la fase orgánica, con la formación de oxi-carbonatos de cinc. El pico exotérmico más apreciable, a ~500 °C, se podría asociar a la descomposición de estos oxi-carbonatos, lo que conduciría a la formación del ZnO. Finalmente, se observa una gran variación de la línea base, lo que indicaría que la conductividad térmica, de la muestra en estudio, varía apreciablemente con relación a la de referencia. Con base en estos resultados, se determinó que un tratamiento térmico a 500 °C, del pre-calcinado era conveniente para obtener el ZnO de interés, al utilizar el método de complejo polimérico – Pechini, (1967) modificado.

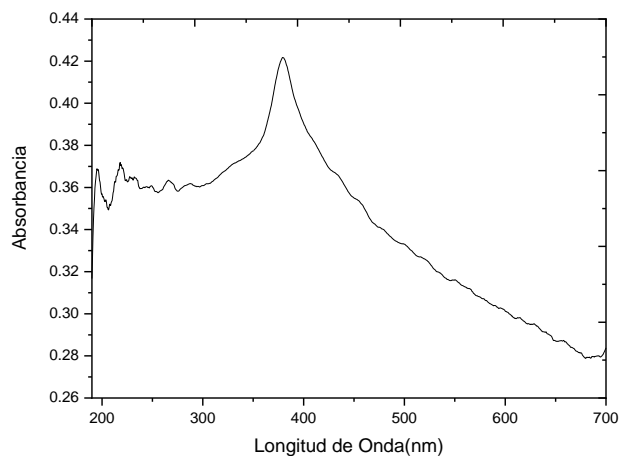




**Figura 3.** Análisis térmico del pre-calcinado obtenido del desarrollo del proceso de síntesis por Pechini, (1967) modificado utilizado en este trabajo: (A) variación del porcentaje de peso y flujo de calor, (B) Pérdida de peso y su derivada y (C) Flujo de calor, al incrementar la temperatura.

### 6.2.2. Espectroscopía de absorción en ultravioleta visible (UV-Vis)

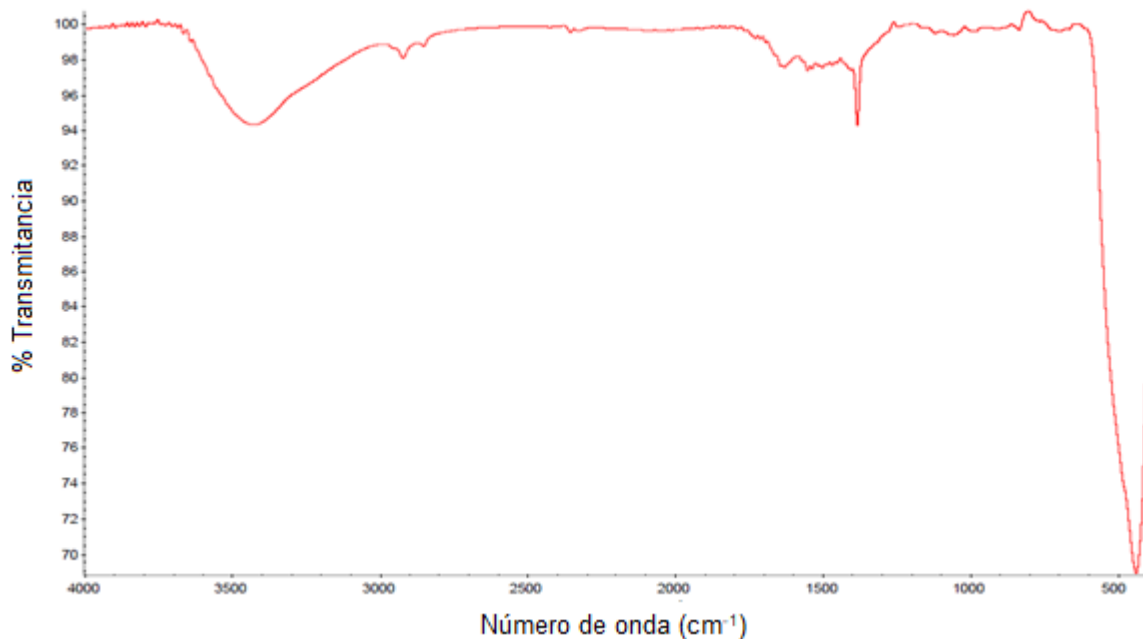
En la Figura 4 se muestra el espectro de absorción en el UV-Vis del ZnO sintetizado a 500 °C. En el espectro se observa un máximo de absorción a 379 nm (3.3 eV) que se puede asociar a la transición electrónica de la banda de valencia a la banda de conducción y que está relacionada con el ancho de la banda prohibida de energía, cuyo valor reportado en la literatura, para el ZnO, es de ~3.3 eV (Chitra et al., 2020; Srikant y Clarke, 1998). Adicionalmente, se observan transiciones electrónicas en el espectro visible (>400 nm) que podrían involucrar los defectos estructurales que existen en la muestra. Estos defectos generan estados de energía que se ubican en el interior de la banda prohibida, como orbitales localizados (Kaygili et al., 2018). Las bandas de absorción ubicadas entre 200 y 350 nm podrían corresponder a transiciones electrónicas entre orbitales localizados sobre los iones de  $Zn^{2+}$  y  $O^{2-}$  (intercambio de carga).



**Figura 4.** Espectro UV-Vis obtenido para polvo de ZnO sintetizado por el método de complejo polimérico - Pechini, (1967) modificado, tratado a 500 °C

### 6.2.3. Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)

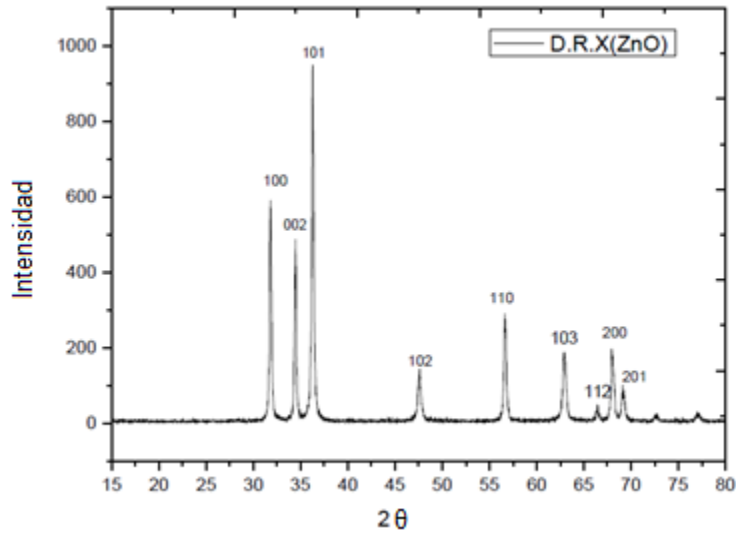
En la Figura 5 se muestra el espectro de absorción IR obtenido para la muestra de ZnO sintetizada por el método de complejo polimérico – Pechini, tratada a 500 °C. En el espectro IR aparecen, principalmente, una banda a  $3435\text{ cm}^{-1}$  que se puede asociar a los grupos hidroxilo –OH presentes en el sólido y una banda centrada en  $430\text{ cm}^{-1}$  característica del óxido de cinc. Las pequeñas bandas entre  $730$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$  podrían corresponder a grupos funcionales que contendrían carbono, adsorbidos sobre la superficie, así como a defectos estructurales con especies  $\text{H}^+$  y  $\text{H}^-$  en su interior, por ejemplo, dentro de vacancias de oxígeno o vacancias de Zn, tal como ocurre en otros sistemas (Ahmed y Senthilkumar, 2021; Kumar y Kumar, 2008a, 2008b; Stankic et al., 2010). Es necesario recordar que las vacancias de oxígeno son uno de los defectos estructurales más importantes que existen en el ZnO. Este resultado indica que el tratamiento térmico a 500 °C fue efectivo para remover la fase orgánica presente en el pre-calcinado.



**Figura 5.** Espectro de absorción IR obtenido para ZnO-NPs sintetizado por el método de Pechini, (1967) modificado, tratado a 500 °C.

#### 6.2.4. Difracción de rayos X

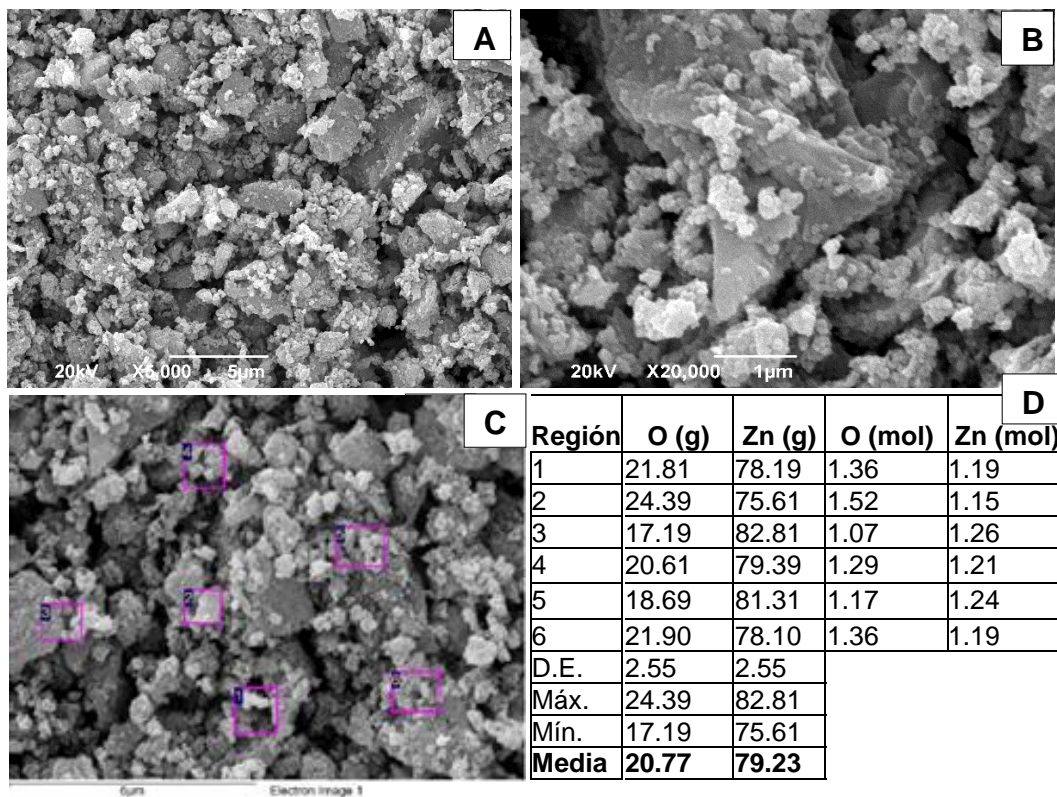
La Figura 6 muestra el difractograma de rayos X del polvo cerámico de ZnO sintetizado por el método Pechini. La muestra presentó una estructura cristalina única, correspondiente al ZnO tipo wurtzita (PDF 75-576), muy bien cristalizada dada la esbeltez de los picos de difracción. Los datos de DRX obtenidos experimentalmente se utilizaron para determinar el tamaño de cristalito del sólido. Específicamente, se usó el pico de mayor intensidad, con índices de Miller (101), y la ecuación de Debye Scherrer,  $t_c = \frac{K \lambda}{\beta \cos(\theta)}$ , donde se tomó como factor de forma  $k=0,9$  y  $\lambda=1.54060 \text{ \AA}$ , y se determinó tanto el ancho a la altura media del pico -  $\beta$  como  $\theta$  (la mitad del ángulo de ubicación del pico en el difractograma) de los datos experimentales. Con la información anterior, y la fórmula indicada, se calculó el tamaño del cristalito del ZnO sintetizado por el método Pechini obteniéndose un valor de 33.20 nm.



**Figura 6.** Difractograma de rayos X del ZnO sintetizado por el método de Pechini (1967) modificado.

#### 6.2.5. Microscopía electrónica de barrido

Las micrografías obtenidas con microscopía electrónica de barrido (Figura 7A, 7B y 7C), de los polvos de ZnO sintetizados, indicaron que las partículas primarias presentaron un tamaño de partícula  $<100$  nm, una morfología esferoidal y gran aglomeración. En la tabla (7D) de la Figura 7 se indica el análisis químico elemental realizado a la muestra de ZnO sintetizada, utilizando la espectroscopía EDS. Considerando las masas atómicas del Zn (65.38 u) y del O (15.99 u), así como las masas relativas indicadas en la tabla (Figura 7D), se realizaron los cálculos correspondientes que indicaron que la muestra no era estequiométrica (un mol de Zn por un mol de O, de acuerdo a la fórmula química del ZnO) y que, aunque existían zonas deficientes de oxígeno, predominaron las zonas ricas en oxígeno (ver Figura 7D). Este resultado llevó a concluir que en este sólido existía, como defecto predominante, oxígeno intersticial ( $O_i$ ).



**Figura 7.** Micrografías MEB de los polvos de ZnO obtenidos por el método de complejo polimérico – Pechini, a 500°C, con diferente magnificación: (A) X6000 y (B) X20.000, así como de las zonas del sólido donde se realizó el análisis químico elemental – espectroscopía EDS (C) y los resultados del mismo (D).

### 6.3. Efecto del óxido de cinc (ZnO) sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de *C. annuum*

#### 6.3.1. Número de semillas germinadas

Se encontró que el número promedio de semillas germinadas de *C. annuum*, para el tratamiento testigo a los 14 días, fue de  $9.6 \pm 0.2$ , o sea del 96%, como se puede observar en la Tabla 2, donde se resume el análisis de datos para las variables evaluadas durante el desarrollo vegetativo juvenil de las plantas. Este porcentaje de germinación proporciona un control del experimento, ya que la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (States y Substances, 1996) reglamenta que, en una prueba de toxicidad, el porcentaje de germinación de semillas de *C. annuum* debe superar el 55% para el tratamiento testigo absoluto.

Como se puede observar en la Figura 8, tanto las plántulas pertenecientes al tratamiento testigo absoluto (Figura 8A), como las provenientes de las semillas sometidas a tratamientos con ZnO-NPs (Figura 8B I-V) y ZnO-MPs (Figura 8C I-V), en concentraciones de 10, 20 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>, presentaron germinación asincrónica, encontrándose desde semillas sin germinar, hasta plántulas con cotiledones completamente expandidos; comportamiento que coincide con lo reportado para esta especie por Demir (2002). No obstante, al evaluar el número de semillas geminadas a los 7 y 14 días, después de la exposición a los tratamientos no se presentaron diferencias significativas entre los mismos (Figura 9 y Tabla 2).

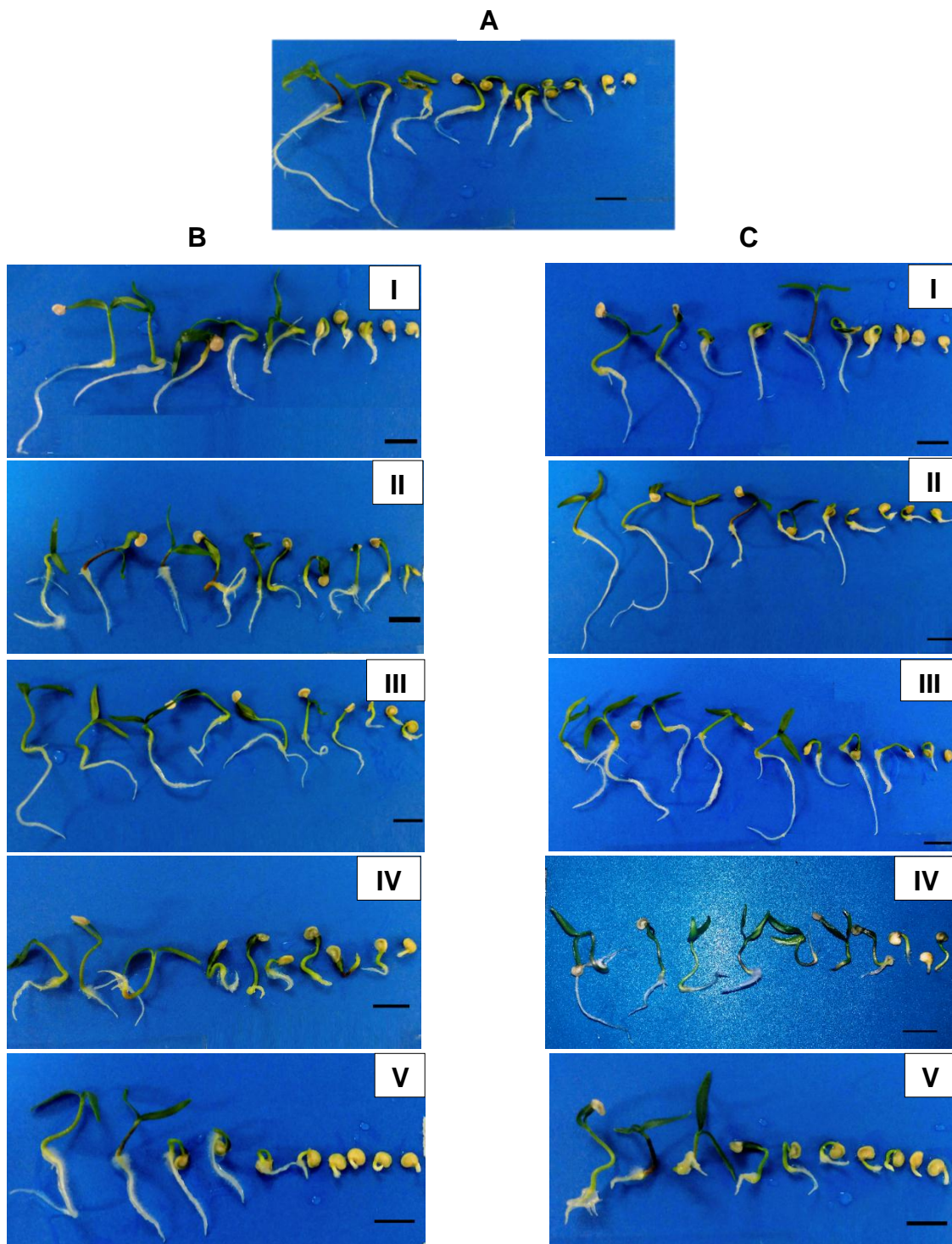
Cruz et al.(2013) señalaron que la capacidad de germinación de las semillas está relacionada con la sensibilidad de estas al tratamiento, por lo cual, el número de semillas de *C. annuum* germinadas, que ellos evaluaron, no fue influenciado por las partículas de ZnO en las concentraciones consideradas. Este resultado coincide con el obtenido en un estudio previo, realizado por García-López et al.



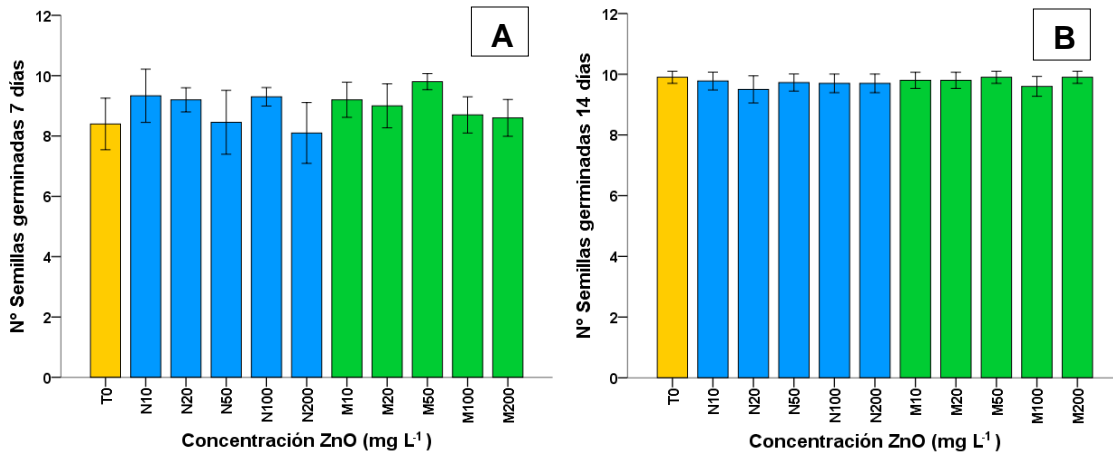
(2018), quienes expusieron semillas de *C. annuum* a concentraciones de ZnO-NPs, entre 100 y 500 mg L<sup>-1</sup>, y tampoco observaron un efecto sobre el porcentaje de germinación.

Por otro lado, Rawashdeh et al. (2020) obtuvieron resultados similares al exponer semillas de *Lactuca sativa* a ZnO-NPs, en concentraciones de 25 y 50 mg L<sup>-1</sup>. Estos investigadores propusieron que, a pesar de este resultado, las partículas de ZnO podrían liberar iones Zn<sup>2+</sup> que afectarían la permeabilidad de la testa de la semilla. Estos iones, al ingresar a la semilla, podrían ocasionar modificaciones en la síntesis de enzimas *de novo* durante la germinación, alterando la movilización de carbohidratos, lo que finalmente propiciaría cambios en la biomasa y la longitud de las plántulas (Rawashdeh et al., 2020). Por lo tanto, aunque no haya efecto sobre el número de semillas germinadas, las partículas de ZnO podrían alterar el desarrollo posterior de las mismas.

Es necesario indicar que el efecto del ZnO, sobre la germinación de las semillas, es aún controversial. Hay trabajos que mencionan que las ZnO-NPs (10-100 mg L<sup>-1</sup>) aumentarían el porcentaje de semillas germinadas de *Vicia faba* (Youssef y Elamawi, 2020). Adicionalmente, se ha reportado que tanto las nano, como las micropartículas de ZnO (50-1600 mg L<sup>-1</sup>) promoverían la germinación de semillas de *Allium cepa* (Tymoszuik y Wojnarowicz, 2020). No obstante, otros estudios mostraron que las ZnO-NPs (800 y 1600 mg L<sup>-1</sup>) ocasionarían una reducción en el porcentaje de germinación en semillas de *Solanum lycopersicum* y *Medicago sativa* (de la Rosa et al., 2013). Lo enunciado indica que, dependiendo de su especie, las semillas podrían tener diferente respuesta a la exposición de ZnO (Faizan et al., 2020; Liu et al., 2020). Es por ello que, para determinar el mecanismo de acción del ZnO sobre las semillas, a nivel molecular, es necesario, a futuro, realizar estudios sistemáticos, rigurosos y detallados, considerando la composición y conformación de la semilla, así como las propiedades fisicoquímicas de las partículas.



**Figura 8.** Plántulas de *C. annuum* provenientes de semillas sin tratamiento o testigo (A) y tratadas con nanopartículas (B) y micropartículas (C) de ZnO, en concentraciones de 10 (I), 20 (II), 50 (III), 100 (IV) y 200 mg L<sup>-1</sup> (V). [Cada fotografía corresponde a una de las repeticiones con 10 individuos, organizados desde el más desarrollado (izquierda) hasta el menos desarrollado (derecha)]. [La barra en la parte inferior derecha representa 1 cm].

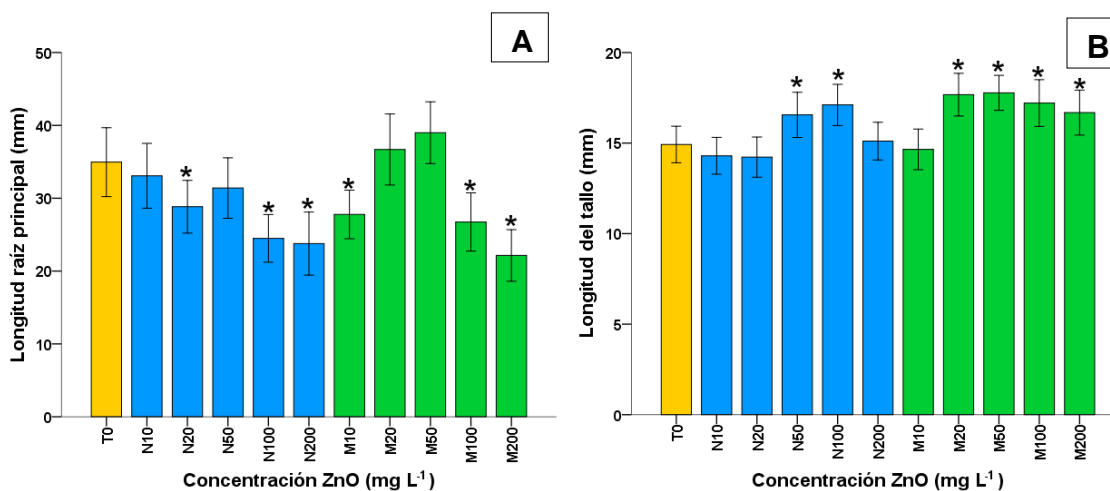


**Figura 9.** Número de semillas de *C. annuum* germinadas, transcurridos 7 (A) y 14 días (B) de exposición a tratamientos con concentraciones de 0 (T0, amarillo), 10, 20, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO nanométrico (N, azul) como micrométrico (M, verde). [Las líneas sobre las barras corresponden a  $\pm 2$  veces el error estándar].

### 6.3.2. Longitud de la raíz y tallo de las plántulas expuestas a partículas de ZnO

La Figura 10A y Tabla 2 indican que las partículas de ZnO causaron reducción en la longitud de la raíz de las plántulas. Los tratamientos que causaron una longitud estadísticamente diferente al testigo se mencionan a continuación y se indica, entre paréntesis, el porcentaje de reducción que ocasionaron respecto a este: ZnO-NPs a 20 mg L<sup>-1</sup> (-18%), 100 mg L<sup>-1</sup> (-30%) y 200 mg L<sup>-1</sup> (-32%); ZnO-MPs a 10 mg L<sup>-1</sup> (-21%), 100 mg L<sup>-1</sup> (-23%) y 200 mg L<sup>-1</sup> (-37%). Los resultados del efecto de las ZnO-NPs sobre la disminución de la longitud de la raíz, coinciden con los obtenidos por Wan et al., (2019), quienes observaron la inhibición de la longitud de la raíz de *Arabidopsis thaliana* causada por ZnO-NPs, en concentraciones entre 20 y 200 mg L<sup>-1</sup>. Para justificar la reducción de la longitud radicular, algunos investigadores han planteado la posibilidad de que las partículas de ZnO disminuyan la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa, encargada de hidrolizar el almidón de la semilla, por lo que la planta tendría menos recursos energéticos para propiciar los procesos metabólicos que favorecerían el crecimiento radicular (Iranbakhsh et al., 2018; Sheteiwy et al., 2016).

Por otro lado, la Figura 10B y la Tabla 2 muestran que 6 de los 10 tratamientos con partículas de ZnO incrementaron la longitud del tallo, significativamente, en comparación con el testigo absoluto. Estos tratamientos se nombran a continuación y se indica, entre paréntesis, el porcentaje de incremento de la longitud del tallo: ZnO-NPs a 50 mg L<sup>-1</sup> (+14%) y 100 mg L<sup>-1</sup> (+16 %); ZnO-MPs a 20 mg L<sup>-1</sup> (+20%), 50 mg L<sup>-1</sup> (+20%), 100 mg L<sup>-1</sup> (+17%) y 200 mg L<sup>-1</sup> (+13%). Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio realizado con *Brassica nigra* que fue expuesta a ZnO-NPs (500-1500 mg L<sup>-1</sup>), en una etapa temprana del desarrollo, donde los investigadores reportaron una disminución de la longitud radicular y, simultáneamente, un aumento en la longitud del tallo (Zafar et al., 2016). Para explicar el crecimiento del tallo, causado por la presencia del ZnO, se podría considerar las funciones del Zn como micronutriente y, por ello, su participación en procesos metabólicos como el de la síntesis de ácido indolacético, auxina que promueve la elongación del tallo (Dileep Kumar et al., 2020) y, también reduce el crecimiento de la raíz (Kochhar y Gujral, 2020; Taiz et al., 2015).



**Figura 10.** Longitud promedio de la raíz principal (A) y tallo (B) en plántulas de *C. annuum*, obtenidas a partir de semillas tratadas con 0(T0, amarillo), 10, 20, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>, tanto de ZnO nanométrico (N, azul) como micrométrico (M, verde), transcurridos 14 días de exposición a estos tratamientos. [El asterisco sobre la barra indica que el tratamiento presenta promedio estadísticamente diferente al testigo ( $p < 0.05$ ) y la línea sobre la barra corresponde a  $\pm 2$  veces el error estándar].

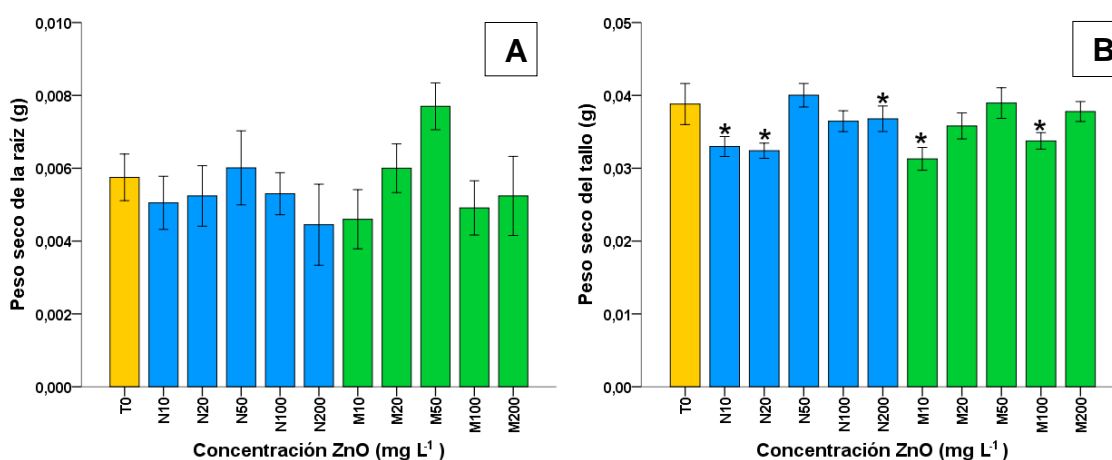
### 6.3.3. Peso seco de la raíz y el tallo de las plántulas

Uno de los principales indicadores de toxicidad en las plantas, en este trabajo posiblemente propiciado por la exposición a nanopartículas, es la reducción de la biomasa, que se determina midiendo el peso seco (Tao et al., 2021). En el presente estudio se encontró que el peso seco de la raíz no fue afectado, significativamente, por la presencia de ZnO-NPs (Figura 11A y Tabla 2). Sin embargo, el peso seco del tallo (Figura 11B y Tabla 2) disminuyó en la proporción indicada entre paréntesis para plántulas obtenidas a partir de semillas expuestas a nano partículas, en concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> (-15%), 20 mg L<sup>-1</sup> (-17%) y 200 mg L<sup>-1</sup> (-13%), y tratadas con micropartículas, en concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> (-19%) y 100 mg L<sup>-1</sup> (-13%). La toxicidad ocasionada por concentraciones bajas (10 mg L<sup>-1</sup>), se podría justificar considerando que estas partículas tendrían mayor solubilidad y liberarían, por lo tanto, mayor cantidad de iones Zn<sup>2+</sup> (Peralta-Videa et al., 2014). Por otro lado, para mayores concentraciones, el efecto de la cantidad de partículas presentes en el medio y su aglomeración afectarían la disolución de las mismas, reduciendo la concentración de iones Zn<sup>2+</sup> disueltos (Lv et al., 2015).

Por otro lado, los defectos estructurales que presentaron las ZnO-NPs sintetizadas en este trabajo, como vacancias de oxígeno (ver sección 6.2.5), podrían ocasionar un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, evidenciado en el peso seco de las plántulas. Ya que estas vacancias podrían mediar y promover la reacción entre electrones y huecos, atrapados en las partículas, con grupos OH<sup>-</sup> y moléculas de O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, generando especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno que propiciarían estrés oxidativo en la planta y, por lo tanto, reducción en su biomasa (Balážová et al., 2020; Molnár et al., 2020).

Considerando los resultados observados para plántulas de *C. annuum*, obtenidas a partir de semillas expuestas a ZnO, se puede afirmar que los tratamientos que redujeron el peso seco del tallo ocasionarían toxicidad en la plántula. Se llega a

esta afirmación debido a que la reducción en el peso seco registrado fue igual o mayor a un 10% (Figura 11A, 11B y Tabla 2), porcentaje considerado como un nivel crítico de toxicidad (Badamasi y Saminu Dagari, 2019; Macnicol y Beckett, 1985). Los resultados mencionados en este trabajo concuerdan con los reportados por Osman et al, (2020) en su estudio, donde las ZnO-NPs que utilizaron para los ensayos ocasionaron disminución en el peso seco del tallo en plántulas de *Trigonella foenum-graecum*.



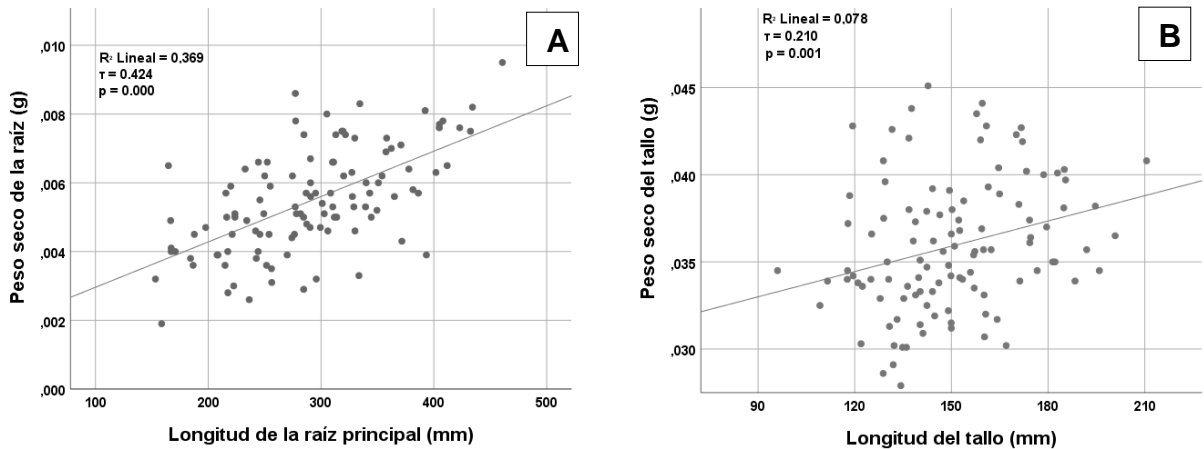
**Figura 11.** Peso seco de raíz (A) y tallo (B) en plántulas de *C. annuum*, obtenidas de semillas expuestas a 0 (T0, amarillo), 10, 20, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>, tanto de ZnO nanométrico (N, azul) como micrométrico (M, verde), después de 14 días de ser sometidas a estos tratamientos. [El asterisco sobre la barra indica que el tratamiento presenta un valor estadísticamente diferente al testigo ( $p < 0.05$ ) y la línea sobre la barra corresponde a  $\pm 2$  veces el error estándar.

#### 6.3.4. Correlación entre la longitud y el peso seco de la raíz y el tallo de las plántulas

Generalmente, la longitud del tallo o la raíz de las plantas y su respectivo peso seco (biomasa) tienen una relación de proporcionalidad directa, bajo condiciones de desarrollo óptimas (Niklas y Enquist, 2001). Con este propósito, se realizó una prueba de correlación de Kendall, entre la longitud de la raíz y su peso seco (Figura 12 A), la cual indicó una correlación moderada significativa, según el coeficiente  $\tau$  obtenido, ( $p = 0.00$ ,  $\tau = 0.424$ ). Así mismo, se realizó una prueba de correlación de Kendall entre la longitud del tallo y el peso seco de este (Figura

12B), dando como resultado una correlación débil significativa ( $p = 0.01$ ,  $\tau = 0.210$ ). Esta correlación débil se pudo deber a que las partículas de ZnO promovieron el aumento de longitud del tallo, mientras que éstas no tuvieron efecto sobre el peso seco del tallo o causaron su disminución respecto al testigo absoluto (Figuras 10B y 11B).

Los resultados obtenidos pueden explicarse debido a que las plántulas de *C. annuum* no solamente crecen de manera longitudinal, sino también radial (Pereira-Dias et al., 2020) y por lo tanto, los tratamientos con partículas de ZnO pudieron tener efecto en la longitud del tallo, pero no en su diámetro con la misma magnitud, lo que también determinaría su biomasa. Adicionalmente, esta respuesta puede estar relacionada con el cambio en los compuestos de la pared celular de las plántulas, ya que estudios previos han reportado que las ZnO-NPs y ZnO-MPs, pueden alterar las rutas metabólicas de compuestos como la lignina (Mazaheri Tirani et al., 2019), por lo que la observación del aumento en la longitud del tallo no siempre se traduce en una mayor acumulación de biomasa.



**Figura 12.** Correlación entre la longitud de la raíz principal y su peso seco (A) y correlación entre la longitud del tallo y su peso seco (B) de todas las plántulas de *C. annuum*.

**Tabla 2.** Valores promedio de las variables estimadas en plántulas de *C. annuum*, obtenidas a partir de semillas tratadas con ZnO, constituido por nanopartículas (N) y micropartículas (M) en concentración de 0 (T0), 10, 20, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>, transcurridos 14 días de exposición a este óxido. [Los valores corresponden al promedio de 10 repeticiones ± el error estándar, valores seguidos de letras iguales en una misma columna no presentan diferencias significativas (p<0.05)].

Tratamiento	Semillas germinadas/ caja	Longitud raíz (mm)	Longitud tallo (mm)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tallo (g)
<b>Testigo (T0)</b>	9.6±0.2 <b>ab</b>	35.01±2.36 <b>a</b>	14.76±0.57 <b>a</b>	0.0058±0.001 <b>a</b>	0.0388±0.0013 <b>a</b>
<b>N 10</b>	9.7±0.1 <b>ab</b>	33.75±2.24 <b>a</b>	14.33±0.56 <b>a</b>	0.0051±0.001 <b>a</b>	0.0330±0.0013 <b>b</b>
<b>N 20</b>	9.5±0.2 <b>b</b>	28.77±2.01 <b>b</b>	14.06±0.59 <b>a</b>	0.0052±0.001 <b>a</b>	0.0324±0.0013 <b>b</b>
<b>N 50</b>	9.4±0.2 <b>b</b>	32.82±2.32 <b>a</b>	16.84±0.60 <b>b</b>	0.0060±0.001 <b>a</b>	0.0400±0.0013 <b>a</b>
<b>N 100</b>	9.6±0.2 <b>ab</b>	24.53±1.68 <b>b</b>	17.12±0.57 <b>b</b>	0.0053±0.001 <b>a</b>	0.0365±0.0013 <b>a</b>
<b>N 200</b>	9.3±0.2 <b>b</b>	26.09±1.99 <b>b</b>	15.15±0.64 <b>a</b>	0.0077±0.001 <b>a</b>	0.0337±0.0013 <b>b</b>
<b>M 10</b>	9.6±0.2 <b>ab</b>	29.52±2.16 <b>b</b>	15.01±0.62 <b>a</b>	0.0046±0.001 <b>a</b>	0.0313±0.0013 <b>b</b>
<b>M 20</b>	9.6±0.2 <b>ab</b>	37.74±2.51 <b>a</b>	17.67±0.56 <b>b</b>	0.0060±0.001 <b>a</b>	0.0358±0.0013 <b>a</b>
<b>M 50</b>	9.9±0.1 <b>a</b>	39.72±2.61 <b>a</b>	17.77±0.55 <b>b</b>	0.0077±0.001 <b>a</b>	0.0390±0.0013 <b>a</b>
<b>M 100</b>	9.3±0.2 <b>b</b>	28.22±1.93 <b>b</b>	17.21±0.57 <b>b</b>	0.0049±0.001 <b>a</b>	0.0338±0.0013 <b>b</b>
<b>M 200</b>	9.7±0.2 <b>ab</b>	23.24±1.52 <b>b</b>	16.68±0.57 <b>b</b>	0.0052±0.001 <b>a</b>	0.0378±0.0013 <b>a</b>



6.4. Efecto de la aplicación de partículas de ZnO en sustrato sobre el desarrollo vegetativo adulto de *C. annuum*

#### 6.4.1. Efecto sobre el desarrollo foliar

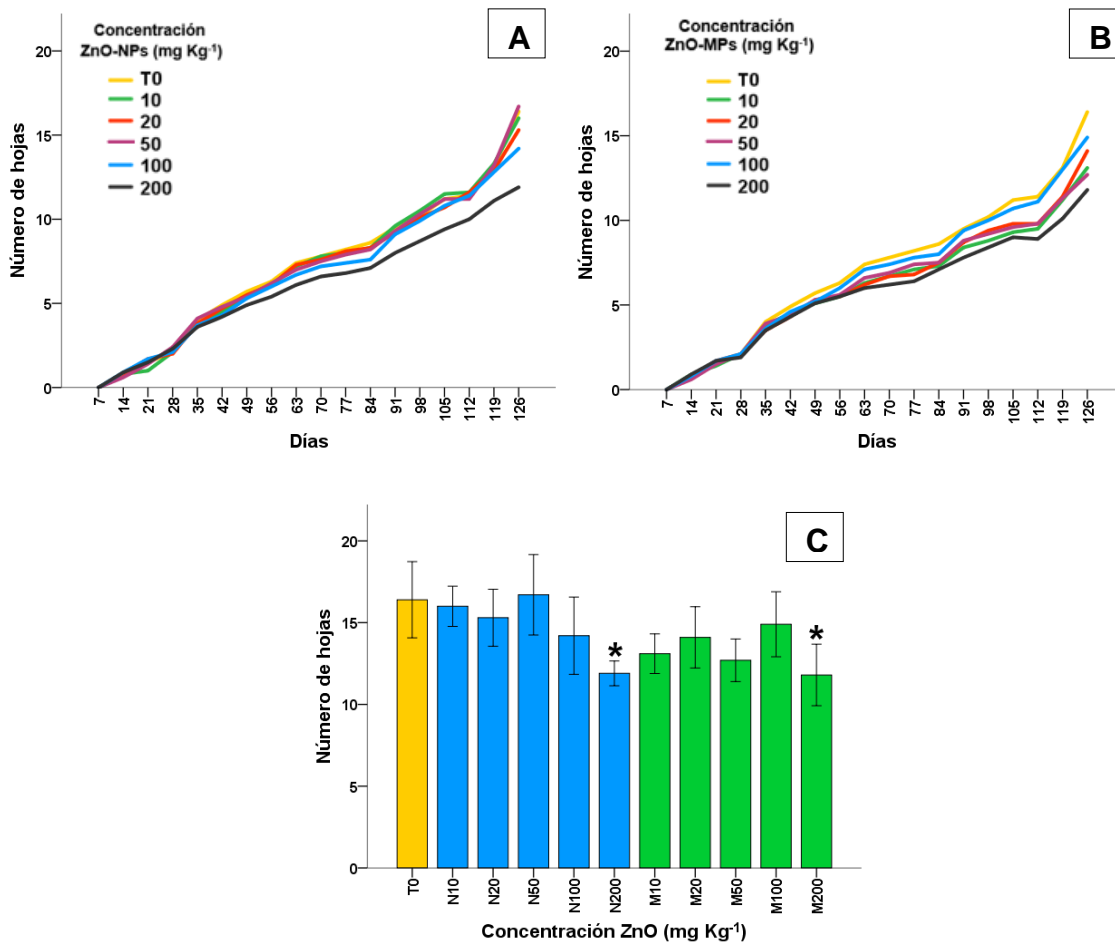
La variable número de hojas desarrolladas en *C. annuum* durante los 126 días de exposición a las ZnO-NPs y ZnO-MPs, adicionado al sustrato de la planta, presentó un incremento que tendió a ser lineal hasta el día 112 (Figura 13A y 13B). Para destacar, a medida que transcurrió el tiempo, las plantas sometidas al tratamiento con mayor concentración de ZnO,  $200 \text{ mg Kg}^{-1}$  independiente de si las partículas tenían tamaño nano o micrométrico, presentaron el menor número de hojas con relación al testigo absoluto, un 25% menos, al final del experimento (Figuras 13A a 13C, Figura 14B y Tabla 3).

Por otro lado, en plantas establecidas en sustrato suplementado con la concentración de ZnO evaluada más alta ( $200 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), el área foliar presentó una reducción significativa con relación a plantas pertenecientes al tratamiento testigo; el efecto inhibitorio fue del 64% para plantas expuestas a ZnO-NPs y del 69% para las sometidas a ZnO-MPs (Figura 14A, 14B, y Tabla 3). Aunque estos tratamientos disminuyeron el área foliar, no se observaron hojas cloróticas o necróticas (Figura 14B), síntomas que indicarían un efecto tóxico crónico del Zn sobre las plantas tratadas con este óxido (Iranbakhsh et al., 2018).

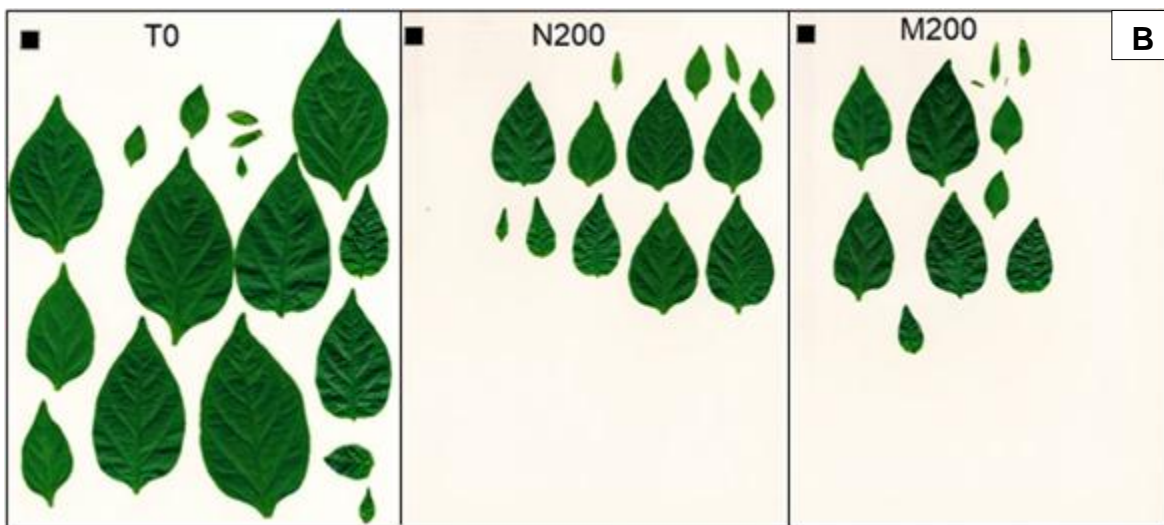
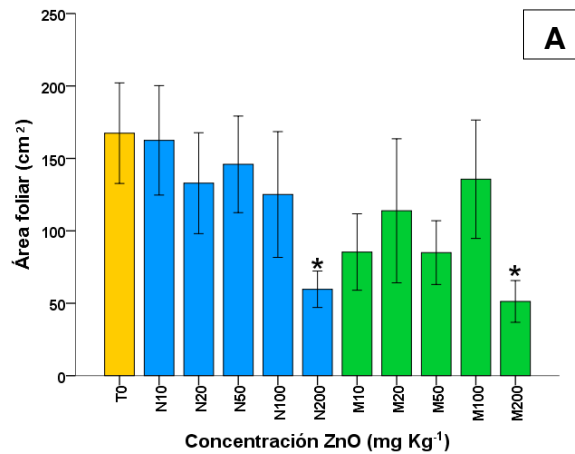
Como se indicará posteriormente, cuando se haga referencia a los resultados obtenidos para las variables relacionadas con el desarrollo de raíz, tallo y yemas florales en las plantas de *C. annuum* sometidas a los tratamientos, éste también fue inhibido cuando se expusieron a las máximas concentraciones de ZnO suministradas. De modo que, considerando lo enunciado, es posible, como también lo indican otros trabajos (Zafar et al., 2020), que la disminución en el

número de hojas y el área foliar propicie una menor capacidad fotosintética de las plantas, lo que afectaría el desarrollo de las mismas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo (Figuras 13 y 14 y Tabla 3) contrastan con los reportados por Awan et al. (2020), quienes encontraron que la exposición de *Brassica oleracea* a ZnO-NPs ocasionó un aumento en el número de hojas y área foliar. Una justificación a esta diferencia en los resultados se podría dar considerando que *B. oleracea* asimila mayor cantidad de Zn que otras especies de plantas (Navarro-León et al., 2016). Adicionalmente, como ya se mencionó, es muy probable que para diferentes especies de plantas se presente distinta respuesta frente a la exposición de las mismas a partículas de ZnO.



**Figura 13.** Número promedio de hojas en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato que contenía concentraciones de 0 (T0), 10, 20, 50, 100 y 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO, tanto nanométrico (A) como micrométrico (B), evaluado durante los 126 días y específicamente al final del periodo de observación (C). [El asterisco sobre las barras indica que los tratamientos presentan promedio estadísticamente diferente al testigo ( $p < 0.05$ ) y la línea sobre las barras corresponde a  $\pm 2$  veces el error estándar].



**Figura 14.** (A) Área foliar promedio de plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato que contenía concentraciones de 0 (T0, amarillo), 10, 20, 50, 100 y 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO, tanto nanométrico (N, azul) como micrométrico (M, verde), evaluada transcurridas 18 semanas de su desarrollo en estas condiciones. (B) Fotografías que ilustran el número de hojas con su área, para plantas establecidas en sustrato desprovisto de ZnO (T0) y suplementado con 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO-NPs (N200) o 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO-MPs [El asterisco sobre las barras indica que estos tratamientos presentan promedio estadísticamente diferente al testigo ( $p < 0.05$ ) y la línea sobre las barras corresponde a  $\pm 2$  veces el error estándar. El cuadro en la parte superior derecha de las fotografías representa 1 cm<sup>2</sup>].

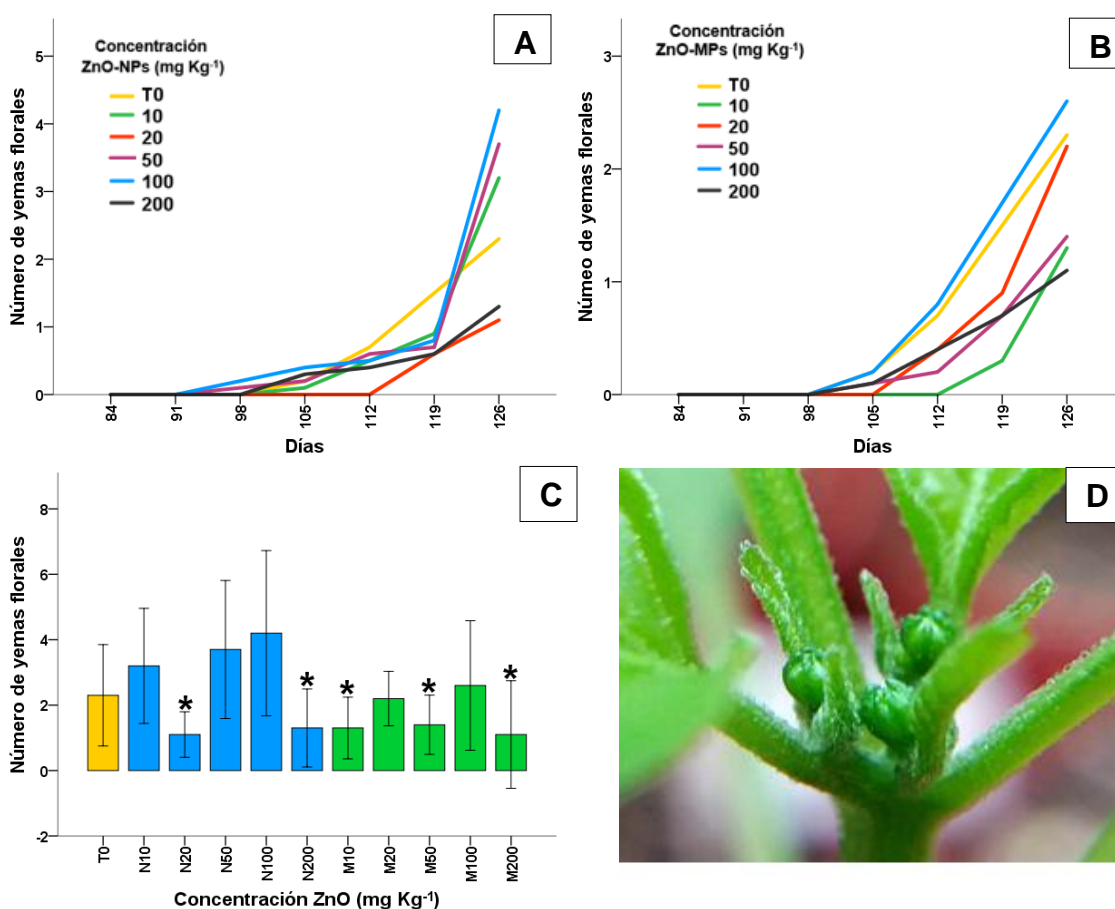
#### 6.4.2. Efecto sobre el desarrollo de yemas florales

La evaluación del desarrollo vegetativo adulto de *C. annuum*, sometidas a tratamiento con partículas de ZnO, se realizó hasta la formación de las primeras yemas florales, las cuales indican la transición del desarrollo vegetativo hacia el reproductivo. Las yemas florales son estructuras que contienen meristemas con capacidad de generar flores (Ramírez y Goyes, 2004). Como se puede apreciar en las Figuras 15A y 15B, estas estructuras empezaron a desarrollarse entre el día 91 y 112 de observación, tal que los tratamientos con 50 y 100 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO-NPs indujeron precocidad. Sin embargo, la diferencia en el tiempo de aparición de las primeras yemas florales, en las plantas tratadas con ZnO, respecto al testigo absoluto, fue de apenas siete días.

Este resultado contrasta con el reportado por Seydmohammadi et al. (2019) quienes encontraron que la aplicación foliar de ZnO-NPs retrasaba el desarrollo floral en *Eustoma grandiflorum*. Esta diferencia se puede justificar considerando que el efecto de las partículas de ZnO, sobre las plantas, puede cambiar si se aplica a la raíz o a la parte aérea. Además, el efecto depende de la frecuencia de aplicación del ZnO (Su et al., 2019), que para el presente trabajo fue de una sola vez. Esta respuesta debe depender, también, de las características de las partículas (de allí la importancia de elaborar una caracterización muy completa de las mismas), su concentración y de las condiciones del medio donde se desarrollen las plantas (García-Gómez et al., 2017; R. P. Singh et al., 2021).

Al finalizar el ensayo (Figura 15C y Tabla 3), el número de yemas florales, en las plantas sometidas a los tratamientos, disminuyó con relación al testigo absoluto, para las plantas sometidas a tratamientos, con concentraciones de ZnO-NPs de 20 mg Kg<sup>-1</sup> (-52%) y 200 mg Kg<sup>-1</sup> (-43%). Así mismo, los tratamientos con ZnO-NPs redujeron el valor de esta variable en concentraciones de 10 mg Kg<sup>-1</sup> (-43%), 50 mg Kg<sup>-1</sup> (-39%) y 200 mg Kg<sup>-1</sup> (-52%). Los resultados obtenidos en el presente

trabajo coinciden con los reportados por Yoon et al, (2014) quienes encontraron que, con una dosis de ZnO-NPs de 500 mg Kg<sup>-1</sup>, se reducía el desarrollo de flores en *Glycine max*. El efecto inhibitorio de las partículas de ZnO, que propició la reducción del número de yemas florales, con la concentración más alta evaluada (Figura 14C y Tabla 3), también coincide con lo reportado por Rout y Das, (2009) quienes encontraron que, para dosis altas de Zn, aplicadas a las plantas, se podría impedir, disminuir o retrasar el desarrollo de estructuras reproductivas.



**Figura 15.** Número promedio de yemas florales en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato que contenían concentraciones de 0 (T0), 10, 20, 50, 100 y 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO: (A) nanométrico (N) y (B) micrométrico (M), estimado durante 126 días de desarrollo, y específicamente al final de este periodo (C). Yemas florales observadas el día 112 de desarrollo en una planta establecida en sustrato suplementado con 100 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO-NPs (D). [El asterisco sobre las barras indica que los tratamientos presentan promedio estadísticamente diferente al

testigo ( $p < 0.05$ ) y la línea sobre las barras corresponde a  $\pm 2$  veces el error estándar].

**Tabla 3.** Número de hojas y yemas florales cuantificado en plantas de *C. annuum*, con 126 días de sembradas en sustrato suplementado con ZnO constituido por nanopartículas (N) o micropartículas (M) en concentraciones de 0 (testigo absoluto), 10, 20, 50, 100 y 200 mg Kg<sup>-1</sup> de sustrato. [Los valores corresponden al promedio de 10 repeticiones  $\pm$  el error estándar, aquellos seguidos de letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )].

Tratamiento	Número de hojas	Número de yemas florales
Testigo	16 $\pm$ 1 a	2 $\pm$ 0.5 a
N 10	16 $\pm$ 1 ab	3 $\pm$ 0.6 a
N 20	15 $\pm$ 1 ab	1 $\pm$ 0.3 b
N 50	17 $\pm$ 1 a	4 $\pm$ 0.6 a
N 100	14 $\pm$ 1 ab	4 $\pm$ 0.7 a
N 200	12 $\pm$ 1 b	1 $\pm$ 0.4 b
M 10	13 $\pm$ 1 ab	1 $\pm$ 0.4 b
M 20	14 $\pm$ 1 ab	2 $\pm$ 0.5 a
M 50	13 $\pm$ 1 ab	1 $\pm$ 0.4 b
M 100	15 $\pm$ 1 ab	3 $\pm$ 0.5 a
M 200	12 $\pm$ 1 b	1 $\pm$ 0.3 b

#### 6.4.3. Efecto de las partículas de ZnO sobre la raíz y el tallo en la fase vegetativa adulta

Con relación a la longitud de la raíz principal de las plantas de *C. annuum*, establecidas en sustrato suplementado con diferentes concentraciones de micro o nanopartículas, se encontró que los tratamientos con ambos tipos de partícula, a una concentración de 200 mg Kg<sup>-1</sup>, propiciaron la disminución en un 37% de la longitud de la raíz principal de las plantas (Figuras 16A y 16C).

Autores como Caldelas et al., (2020) y Wan et al., (2019), indicaron que la reducción de la longitud de la raíz de las plantas, ocasionada por el efecto de partículas de ZnO, se puede dar en dos zonas de crecimiento de la misma. La primera ocurriría en el meristemo apical donde la multiplicación celular estaría

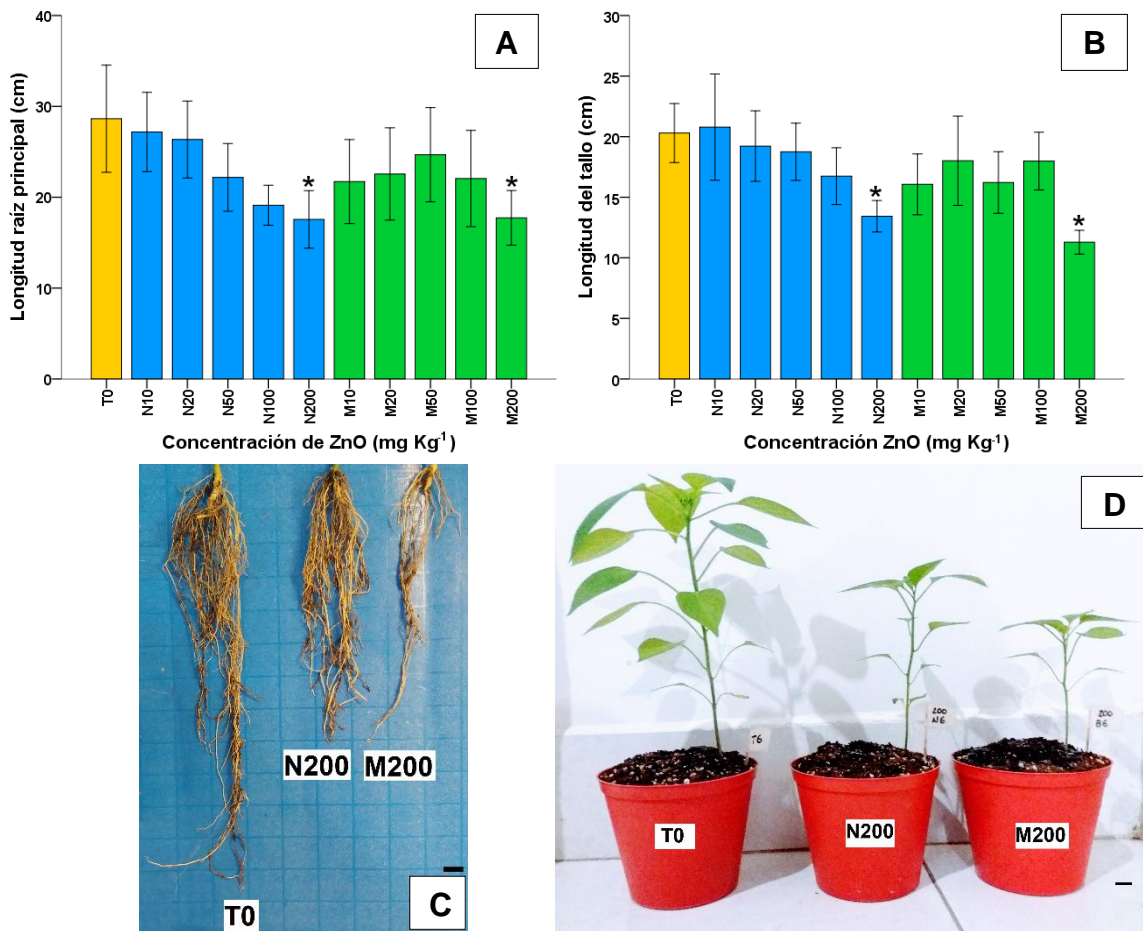
inhibida, principalmente, por la presencia de iones  $Zn^{2+}$  disociados de las partículas. La segunda zona de elongación celular sería afectada, principalmente, por las ZnO-NPs. En el caso de las ZnO-MPs, estas tendrían impedimento para transportarse, como partícula, al interior de la planta. Como ellas tienen un tamaño superior a los 100 nm y debido a que los poros de las paredes celulares de las plantas tienen un tamaño entre 5 y 20 nm (Rajneesh et al., 2018), se presentaría una barrera o impedimento para la movilidad de las micropartículas. Por lo mencionado, se estaría favorecido el transporte de los iones cinc –  $Zn^{2+}$  y el de las nanopartículas hacia el interior de las plantas, indudablemente considerando que las partículas no se aglomeren.

En cuanto a la longitud del tallo, se encontró que las ZnO-NPs condujeron a una inhibición de su crecimiento del 35% y las ZnO-MPs, del 45%, para la dosis de  $200 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Figuras 16B y 16D). Un posible mecanismo a considerar, para explicar este efecto inhibitorio, podría involucrar el transporte de especies de cinc. En este aspecto, los iones  $Zn^{2+}$ , generados por disolución y disociación de las ZnO-NPs y ZnO-MPs podrían ser absorbidos y transportados desde la raíz hacia el tallo. Adicionalmente, las ZnO-NPs podrían entrar en la raíz mediante la ruta apoplástica y, posteriormente, atravesar la banda de Caspary mediante endocitosis hasta alcanzar el simplasto y el sistema vascular de la planta, llegando, finalmente, a la parte aérea (Chen et al., 2018; Lv et al., 2015).

De hecho, trabajos recientes indican que las ZnO-NPs o los iones  $Zn^{2+}$  disociados podrían sufrir transformaciones, encontrándose en la parte aérea como fosfato de cinc o como complejos Zn-histidina (da Cruz et al., 2019; Lv et al., 2021). Por lo tanto, con base en lo enunciado, la reducción en el crecimiento del tallo se podría explicar considerando el efecto de las ZnO-NPs, los iones  $Zn^{2+}$  o sus compuestos modificados sobre el crecimiento del tallo, en el meristemo apical del mismo, ya que el Zn podría ser translocado, de manera preferencial, hacia la parte aérea como un mecanismo de defensa para evitar posibles daños en la raíz. Esto



ocurriría, específicamente, para concentraciones altas de Zn (Long et al., 2003; Nemček et al., 2020; Singh y Kumar, 2016).



**Figura 16.** Longitud promedio de la raíz principal (A) y del tallo (B) en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato que contenía concentraciones de 0 (T0, amarillo), 10, 20, 50, 100 y 200 mg Kg<sup>-1</sup>, de ZnO nanométrico (N, azul) y micrométrico (M, verde), transcurridos 126 días de exposición a estos tratamientos. Además, se muestran raíces de plantas establecidas en sustrato desprovisto de ZnO (T0) y provisto con 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO-NPs (N200) o 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO-MPs (M200) fotografía (C) y tallos de plantas sembradas en sustrato con las mismas especificaciones (D). [El asterisco sobre la barra indica que el tratamiento presenta promedio estadísticamente diferente al testigo ( $p < 0.05$ ) y la línea sobre la barra corresponde a  $\pm 2$  veces el error estándar. La barra inferior de las fotografías representa 1 cm].

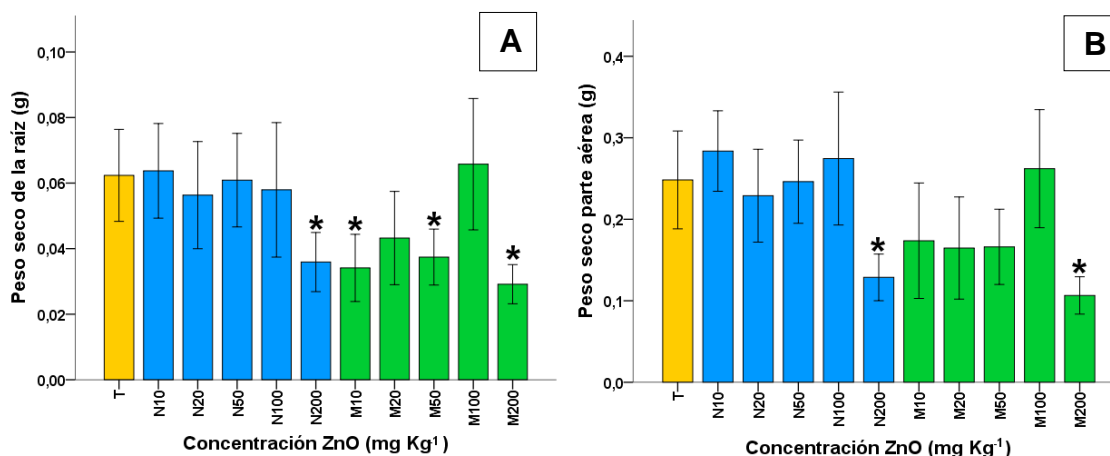
Como ya se mencionó, uno de los principales indicadores de toxicidad de las ZnO-NPs, en las plantas, es la acumulación de biomasa (Tao et al., 2021), que se puede determinar midiendo el peso de las plantas. En este sentido, se ha reportado que, por lo general, las ZnO-NPs generan un efecto más inhibitorio que las micropartículas (Sadasivam et al., 2018). Sin embargo, como se observa en la Figura 17 A y Tabla 4, tan solo la exposición a ZnO-NPs, en concentración de 200 mg Kg<sup>-1</sup>, produjo menor peso seco de la raíz en comparación con el testigo absoluto. En cambio, las ZnO-MPs causaron la reducción del peso seco de la raíz en 3 de las 5 concentraciones evaluadas: 10 mg Kg<sup>-1</sup> (-45%), 50 mg Kg<sup>-1</sup> (-40%) y 200 mg Kg<sup>-1</sup> (-53%).

Esta diferencia entre el efecto causado por los dos tipos de partícula de ZnO, en el rango de concentraciones evaluado, podría ser ocasionado por la aglomeración de las ZnO-NPs (ver Figura 7), lo que ocasionaría reducción en su reactividad (Labilie y Brant, 2010). Adicionalmente, dadas las características particulares que presentan las ZnO-NPs, se podría favorecer su adsorción sobre los componentes del sustrato, debido a su alta energía superficial, restringiéndose su transporte e interacción con la raíz de las plantas (Kouhi et al., 2015). Es por esto que, en futuras investigaciones, es necesario evaluar la interacción de las nanopartículas con el sustrato y la cantidad de iones Zn<sup>2+</sup> liberados por las partículas, para poder diferenciar entre la fitotoxicidad causada por iones y la causada por ZnO-NPs o ZnO-MPs.

La reducción del peso seco se podría justificar considerando que el Zn, en una dosis alta, impediría la acumulación de biomasa en las plantas y que además, como se reportó recientemente (Balážová et al., 2020; Plaksenkova et al., 2020), las ZnO-NPs o los iones Zn<sup>2+</sup>, que se disocian de las ZnO-NPs o ZnO-MPs, podrían ocasionar daños en las células de las plantas mediante estrés oxidativo,

genotoxicidad, citotoxicidad o competencia con iones divalentes en los sitios activos de las enzimas (Dimkpa et al., 2015).

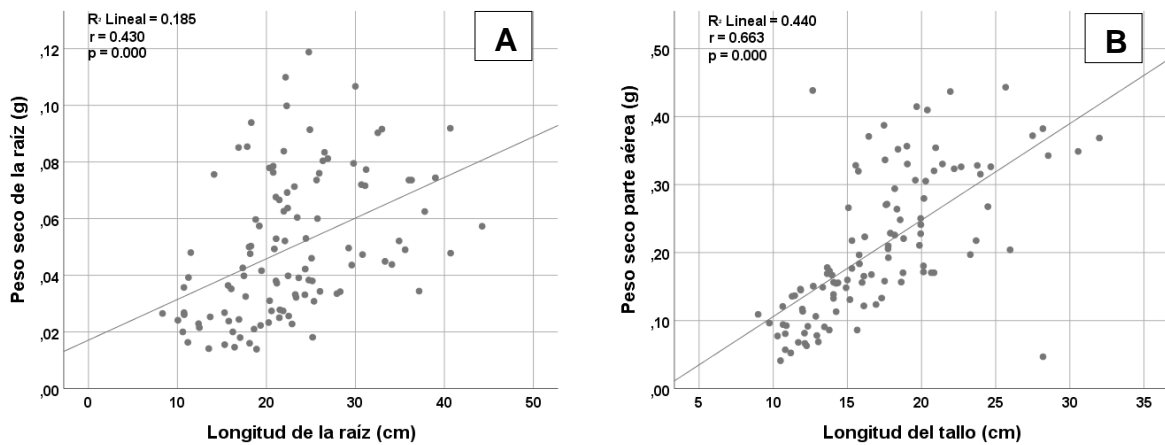
Por otro lado, el peso seco del tallo (Figura 17 B) disminuyó significativamente, respecto al testigo, para la concentración más alta evaluada (200 mg Kg<sup>-1</sup>), tanto de ZnO-NPs como de ZnO-MPs, en un 48 y 58%, respectivamente. Por lo tanto, las concentraciones que propiciaron una reducción significativa del peso seco se pueden considerar tóxicas, ya que estos tratamientos causaron una reducción superior al 10% en la biomasa de las plantas de *C. annuum* (Badamasi y Saminu Dagari, 2019; Macnicol y Beckett, 1985). Este resultado coincide con el reportado por Kouhi et al. (2015), quienes evaluaron la exposición de *Brassica napus* a iones Zn<sup>2+</sup>, ZnO-NPs y ZnO-MPs, utilizando concentraciones entre 10 y 250 mg L<sup>-1</sup>. Estos investigadores concluyeron que los iones Zn<sup>2+</sup> fueron los que más afectaron el crecimiento de *B. napus*, seguidos en su orden por las micropartículas (ZnO-BPs por su abreviatura en inglés) y finalmente las nanopartículas (ZnO-NPs).



**Figura 17.** Peso seco de la raíz (A) y del tallo (B), en plantas de *C. annuum* sembradas en sustrato que contenía concentraciones de 0 (T0, amarillo), 10, 20, 50, 100 y 200 mg Kg<sup>-1</sup> de ZnO nanométrico (N, azul) y micrométrico (M, verde), transcurridos 126 días del ensayo. [El asterisco sobre la barra indica que las plantas sometidas a este tratamiento, presentaron para la variable un promedio estadísticamente diferente al testigo ( $p < 0.05$ ) y la línea sobre la barra corresponde a  $\pm 2$  veces el error estándar].

#### 6.4.4. Correlación entre la longitud y el peso seco de la raíz y la parte aérea de las plantas

Para determinar la asociación entre la longitud y el peso seco, tanto de la raíz como del tallo en las plantas adultas de *C. annuum*, se realizó una prueba de correlación de Pearson. El coeficiente de correlación,  $r$  ( $p = 0.000$ ,  $r = 0.430$ ) entre la longitud de la raíz y su peso seco (Figura 18A) indicó una correlación significativa, positiva y moderada entre estas dos variables. Así mismo, el coeficiente de correlación ( $p = 0.000$ ,  $r = 0.663$ ) entre la longitud del tallo y el peso seco de la parte aérea (Figura 18B) indicó una correlación significativa, positiva y moderada. Esta relación de proporcionalidad moderada, posiblemente se obtuvo debido a que la biomasa de las plantas no solamente depende del crecimiento longitudinal sino también radial, y de factores como la densidad y composición celular (Carpita y McCann, 2020; Gallego-Giraldo et al., 2016; Kong et al., 2021). Por lo tanto, las variables de crecimiento, adicionales a la longitud, podrían tener influencia sobre la generación de biomasa en las plantas de *C. annuum*.



**Figura 18.** Correlación entre la longitud de la raíz principal y su peso seco (A) y correlación entre la longitud del tallo y su peso seco (B) de todas las plantas de *C. annuum*.

## 6.5. Consideraciones finales

Como se puede observar en los resultados obtenidos de esta investigación, las partículas de ZnO (ZnO-NPs o ZnO-MPs) en las concentraciones empleadas (10, 20, 50, 100 y 200 mg Kg<sup>-1</sup>) incrementaron, disminuyeron o no propiciaron diferencias significativas en las variables evaluadas, dependiendo del estado de desarrollo vegetativo (juvenil o adulto) en que se encontraba *C. annuum*. Estas diferencias en cuanto al efecto del ZnO sobre *C. annuum*, en función de su etapa de desarrollo, se podría justificar si se considera la expresión de genes que regulan la síntesis de proteínas transportadoras de Zn, según los requerimientos nutricionales en cada fase del ciclo de vida de la planta (Ajeesh Krishna et al., 2020; Akther et al., 2020; Cu et al., 2020). Así mismo, la respuesta de las plantas, frente al suministro de ZnO, está determinada por la absorción, transporte y acumulación de Zn (Deshpande et al., 2018; Nair y Chung, 2017).

Por otro lado, la exposición de las plantas de *C. annuum* a las partículas de ZnO podría alterar la homeóstasis del Zn en la planta y propiciar, además, un cambio en su balance nutricional (Balážová et al., 2020; Farghaly et al., 2020). Este hecho permitiría a futuro implementar programas de biofortificación en esta especie, ya que es urgente solucionar los problemas nutricionales de la población humana, para la que el Zn también es un micronutriente (Umar et al., 2020). Adicionalmente, las concentraciones con las cuales no se observaron efectos inhibitorios, podrían ser utilizadas considerando su potencial uso, como: nano-fungicidas, nano-pesticidas, nano-bactericidas y nano-sensores en las plantas de *C. annuum*, promoviendo así el desarrollo de una agricultura sustentable con el medio ambiente (Verma et al., 2022). No obstante, es necesario resaltar que, aunque el crecimiento de la planta es un indicador del efecto de las ZnO-NPs o

ZnO-MPs, sobre esta, no es suficiente con su evaluación. Para tener un conocimiento más profundo, de los mecanismos de interacción de las ZnO-NPs o ZnO-MPs con *C. annuum*, es necesario complementar el presente estudio con otros que consideren el sistema de defensa de la planta, los procesos genéticos, la fotosíntesis, además del transporte, absorción y transformación de nutrientes (García-Gómez et al., 2018).

**Tabla 4.** Valores promedio de variables estimadas en las plantas de *C. annuum*, transcurridos 126 días de establecidas en sustrato suplementado con 0 (T0), 10, 20, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO como nanopartículas (N) o micropartículas (M). [Los valores corresponden al promedio de 10 repeticiones ± el error estándar, valores seguidos de letras iguales en una misma columna no presentan diferencias significativas (p<0.05)].

Tratamiento	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Longitud raíz (cm)	Longitud tallo (cm)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tallo (g)
<b>Testigo (T0)</b>	167.42±24.02 a	27.34±2.62 a	20.30±1.51 a	0.0624±0.0222 d	0.2483±0.0949 bcd
<b>N 10</b>	162.46±23.31 a	26.38±2.53 ab	20.79±1.54 a	0.0637±0.0228 d	0.2837±0.0781 d
<b>N 20</b>	132.89±19.07 a	25.5±2.44 ab	19.22±1.43 ab	0.0563±0.0259 cd	0.2289±0.0901 bcd
<b>N 50</b>	145.90±20.93 a	21.28±2.04 ab	18.75±1.39 ab	0.0609±0.0225 d	0.2462±0.0808 bcd
<b>N 100</b>	125.11±17.95 a	18.83±1.81 ab	16.74±1.24 ab	0.0579±0.0324 bcd	0.2745±0.1289 cd
<b>N 200</b>	59.69±8.56 bc	16.85±1.62 b	13.43±1.00 bc	0.0359±0.0143 abc	0.1287±0.0453 a
<b>M 10</b>	85.38±12.25 abc	20.61±1.98 ab	16.06±1.19 abc	0.0341±0.0162 ab	0.1737±0.1120 abc
<b>M 20</b>	113.84±16.33 ab	21.11±2.02 ab	18.01±1.34 ab	0.0432±0.0225 abcd	0.1647±0.0991 ab
<b>M 50</b>	84.96±12.19 abc	23.43±2.25 ab	16.22±1.20 ab	0.0374±0.0135 abc	0.1662±0.0731 ab
<b>M 100</b>	135.64±19.46 a	20.74±1.99 ab	17.99±1.34 ab	0.0658±0.0317 d	0.2621±0.1146 bcd
<b>M 200</b>	51.27±7.36 c	16.97±1.63 b	11.29±0.84 c	0.0292±0.0095 a	0.1065±0.0362 a

## 7. CONCLUSIONES

- El efecto de las nano y micropartículas de ZnO dependió del estado de desarrollo de *Capsicum annuum*; puesto que no se observó un efecto de este óxido sobre el número de semillas germinadas, pero sí sobre la longitud y la biomasa de las plántulas provenientes de estas semillas, expuestas a algunas concentraciones de óxido de cinc. Por otro lado, en las plantas establecidas en sustrato, suplementado con 200 mg Kg<sup>-1</sup> de nano y micropartículas, se pudo observar un efecto inhibitorio sobre número de hojas, área foliar, número de yemas florales, peso seco y longitud de la raíz y el tallo. Adicionalmente, se encontró que la exposición a nanopartículas de ZnO, en concentraciones de 50 y 100 mg Kg<sup>-1</sup>, podrían causar precocidad en el desarrollo de yemas florales.
- El método de complejo polimérico - Pechini modificado permitió obtener partículas de ZnO con un tamaño dentro del rango nanométrico de manera reproducible y controlada.
- Las plántulas de *C. annuum*, provenientes de semillas expuestas a nano (ZnO-NPs) y micropartículas de ZnO (ZnO-MPs), no se presentó una disminución en la longitud de la raíz cuando las concentraciones aplicadas fueron, 10 y 50 mg L<sup>-1</sup>, de ZnO-NPs, o 20 y 50 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-MPs. Por otro lado, la longitud del tallo aumentó cuando se emplearon concentraciones de 50 ó 100 mg L<sup>-1</sup>, de ZnO-NPs, y 20, 50, 100 ó 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-MPs.
- La aplicación de nano y micropartículas de ZnO a semillas de *C. annuum*, independiente de la concentración, no afectó el peso seco de la raíz de plántulas obtenidas a partir de estas semillas. Sin embargo, se observó un efecto inhibitorio sobre el peso seco de su tallo cuando las semillas fueron expuestas a concentraciones de 10, 20 ó 200 mg L<sup>-1</sup>, de ZnO-NPs, y 10 ó 100 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-MPs.



- La aplicación de nano y micropartículas de ZnO a semillas de *C. annuum*, en las concentraciones utilizadas, no tuvo efecto sobre el peso seco de raíz de plántulas obtenidas a partir de estas semillas. No obstante, se observó un efecto inhibitorio, sobre el peso seco de su tallo, cuando las semillas fueron tratadas con concentraciones de 10, 20 ó 200 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-NPs, o 10 y 100 mg L<sup>-1</sup> de ZnO-MPs.
- Los tratamientos aplicados en concentraciones de 20 y 200 mg L<sup>-1</sup>, de ZnO-NPs, o de 10, 50 y 200 mg L<sup>-1</sup>, de ZnO-MPs, propiciaron disminución del número de yemas florales.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Latef, A.A.H., Abu Alhmad, M.F., Abdelfattah, K.E., 2017. The Possible Roles of Priming with ZnO Nanoparticles in Mitigation of Salinity Stress in Lupine (*Lupinus termis*) Plants. *J. Plant Growth Regul.* 36, 60–70. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9618-x>
- Ahmed, A.S., Sánchez, C.P., Candela, M.E., 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 817–824. <https://doi.org/10.1023/A:1008780022925>
- Ahmed, E., Senthilkumar, K., 2021. VZn–H complex defect induced ferromagnetic behavior of unintentional hydrogen doped ZnO nanoparticles. *Mater. Sci. Semicond. Process.* 123, 105593. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2020.105593>
- Ajeesh Krishna, T.P., Maharajan, T., Victor Roch, G., Ignacimuthu, S., Antony Ceasar, S., 2020. Structure, Function, Regulation and Phylogenetic Relationship of ZIP Family Transporters of Plants. *Front. Plant Sci.* 11, 662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00662>
- Akther, M.S., Das, U., Tahura, S., Prity, S.A., Islam, M., Kabir, A.H., 2020. Regulation of Zn uptake and redox status confers Zn deficiency tolerance in tomato. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 273, 109624. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109624>
- Alloway, B.J., 2008. in *Soils and crop nutrition*, 2a ed, J Chemother.
- Antonio, A.S., Wiedemann, L.S.M., Veiga Junior, V.F., 2018. The genus: *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *RSC Adv.* 8, 25767–25784. <https://doi.org/10.1039/c8ra02067a>
- Araujo, E., Benavides, M., Agronómica, J.F.-A., 2010, U., 2010. Efecto de la fertilización en la nutrición y rendimiento de ají (*Capsicum* spp.) en el Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica* 59, 55–94. <https://doi.org/10.01.10>
- Awan, S., Shahzadi, K., Javad, S., Tariq, A., Ahmad, A., Ilyas, S., 2021. A preliminary study of influence of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of *Brassica oleracea* var *italic*. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 20, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.10.003>
- Azofeifa, A., Moreira, M., 2004. Análisis de crecimiento de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. cv. Hot), en Alajuela, Costa Rica. *Agron. costarricense* 28, 57–67.
- Azor, A., 2018. Estrategias de síntesis para la obtención de nanoóxidos complejos: variaciones composicionales mediante procesos de una sola etapa. Universidad Complutense de Madrid.
- Badamasi, H., Saminu Dagari, M., 2019. Responses of Hydroponically Grown Sorghum (*Sorghum bicolor* L.M) to Zinc (Zn) Stress. *Trends J. Sci. Res.* 4, 111–120. <https://doi.org/10.31586/chemistry.0403.04>
- Balakrishnan, K., 1999. Studies on nutrient deficiency symptoms in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Indian J. Plant Physiol.* .. Vol 4, 229–231.
- Balážová, Ľ., Baláž, M., Babula, P., 2020. Zinc oxide nanoparticles damage tobacco BY-2 cells by oxidative stress followed by processes of autophagy and programmed cell death. *Nanomaterials* 10, 1066. <https://doi.org/10.3390/nano10061066>
- Barkataki, M.P., Singh, T., 2019. Plant-nanoparticle interactions: Mechanisms, effects, and approaches, en: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., pp. 55–83. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.09.007>

- Bäurle, I., Dean, C., 2006. The Timing of Developmental Transitions in Plants. *Cell* 125, 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.005>
- Bonilla C, C.R., 1994. Boro y zinc: dos elementos limitantes en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario.
- Bosland, P.W., Votava, E.J., 2012. Pepper vegetable and spice capsicums. Cambridge CABI 2nd ed., 230.
- Bove, J., Jullien, M., Grappin, P., 2002. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol.* 3, 1–5. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews1002>
- Bravo, I., Giraldo, E., 2003. Manual de prácticas de química agrícola: análisis de suelos, 1a ed. Universidad del Cauca.
- Buchanan, B., Gruissen, W., Jones, R., 2015. Biochemistry and Molecular Biology of Plants (second edition), Wiley, Blackwell (Chichester, UK). Wiley Blackwell.
- Caldelas, C., Poitrasson, F., Viers, J., Araus, J.L., 2020. Stable Zn isotopes reveal the uptake and toxicity of zinc oxide engineered nanomaterials in: *Phragmites australis*. *Environ. Sci. Nano* 7, 1927–1941. <https://doi.org/10.1039/d0en00110d>
- Carpita, N.C., McCann, M.C., 2020. Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy. *J. Biol. Chem.* 295, 15144–15157. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.014561>
- Castillo-González, J., Ojeda-Barrios, D., Hernández-Rodríguez, A., González-Franco, A.C., Robles-Hernández, L., López-Ochoa, G.R., 2018. Zinc metalloenzymes in plants. *Interciencia* 43, 242–248.
- Chen, J., Dou, R., Yang, Z., You, T., Gao, X., Wang, L., 2018. Phytotoxicity and bioaccumulation of zinc oxide nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 130, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.019>
- Chen, L., Kang, Y.H., 2014. In vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of red pepper (*Capsicum Annuum* L.) including pericarp, placenta, and stalk. *J. Food Biochem.* 38, 300–306. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12048>
- Chhipa, H., 2017. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. *Environ. Chem. Lett.* 15, 15–22. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0600-4>
- Chitra, M., Mangamma, G., Uthayarani, K., Neelakandeswari, N., Girija, E.K., 2020. Band gap engineering in ZnO based nanocomposites. *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures* 119, 113969. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2020.113969>
- Cohen, O., Borovsky, Y., David-Schwartz, R., Paran, I., 2014. *Capsicum annuum* S (CaS) promotes reproductive transition and is required for flower formation in pepper (*Capsicum annuum*). *New Phytol.* 202, 1014–1023. <https://doi.org/10.1111/nph.12711>
- Cruz, J.M., Lopes, P.R.M., Montagnolli, R.N., Tamada, I.S., Silva, N.M.M.G., Bidoia, E.D., 2013. Toxicity Assessment of Contaminated Soil Using Seeds as Bioindicators. *J. Appl. Biotechnol.* 1, 49–54. <https://doi.org/10.5296/jab.v1i1.3408>
- Cu, S.T., Guild, G., Nicolson, A., Velu, G., Singh, R., Stangoulis, J., 2020. Genetic dissection of zinc, iron, copper, manganese and phosphorus in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and rachis at two developmental stages. *Plant Sci.* 291, 110338. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110338>
- da Cruz, T.N.M., Savassa, S.M., Montanha, G.S., Ishida, J.K., de Almeida, E., Tsai, S.M., Lavres Junior, J., Pereira de Carvalho, H.W., 2019. A new glance on root-to-shoot in vivo zinc transport and time-dependent physiological effects of ZnSO<sub>4</sub> and ZnO nanoparticles on plants. *Sci. Rep.* 9, 10416. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46796-3>
- de la Rosa, G., López-Moreno, M.L., de Haro, D., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R.,

- Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Effects of ZnO nanoparticles in alfalfa, tomato, and cucumber at the germination stage: Root development and X-ray absorption spectroscopy studies. *Pure Appl. Chem.* 85, 2161–2174. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-12-09-05>
- De Pellegrin, M.L., Rohrhofer, A., Schuster, P., Schmidt, B., Peterburs, P., Gessner, A., 2021. The potential of herbal extracts to inhibit SARS-CoV-2: a pilot study. *Clin. Phytoscience* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40816-021-00264-6>
- Demir, I., 2002. The effect of controlled hydration treatment on germination and seedling emergence of unaged and aged pepper seeds during development. *Isr. J. Plant Sci.* 50, 251–257. <https://doi.org/10.1560/H48T-15QP-DEJ9-VU6Q>
- Deshpande, P., Dapkekar, A., Oak, M., Paknikar, K., Rajwade, J., 2018. Nanocarrier-mediated foliar zinc fertilization influences expression of metal homeostasis related genes in flag leaves and enhances gluten content in durum wheat. *PLoS One* 13, e0191035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191035>
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Casanoves, F., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2020. InfoStat: software estadístico. Univ. Nac. Córdoba.
- Dileep Kumar, G., Raja, K., Natarajan, N., Govindaraju, K., Subramanian, K.S., 2020. Invigouration treatment of metal and metal oxide nanoparticles for improving the seed quality of aged chilli seeds (*Capsicum annum* L.). *Mater. Chem. Phys.* 242, 122492. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122492>
- Dimkpa, C.O., Hansen, T., Stewart, J., McLean, J.E., Britt, D.W., Anderson, A.J., 2015. ZnO nanoparticles and root colonization by a beneficial pseudomonad influence essential metal responses in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Nanotoxicology* 9, 271–278. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.900583>
- do Rêgo, E.R., Finger, F.L., do Rêgo, M.M., 2016. Production and breeding of chilli peppers (*capsicum* spp.), *Production and Breeding of Chilli Peppers (Capsicum Spp.)*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06532-8>
- Ealias, A.M., Saravanakumar, M.P., 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 263, 032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
- Escobar, G., Davila, G., Henao, M., 2004. Diagnóstico nutricional en mandarina clementina de nules en dos períodos estacionales en la zona plana del Valle del Cauca. *Rev. Reg. Noved. técnicas* 6, 9–19.
- Evans, C., 1973. *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Faizan, M., Hayat, S., Pichtel, J., 2020. Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Crop Plants: A Perspective Analysis. pp. 83–99. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8_4)
- FAO, 2020. FAOSTAT [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (consultado 1.17.21).
- Farghaly, F.A., Radi, A.A., Al-Kahtany, F.A., Hamada, A.M., 2020. Impacts of zinc oxide nano and bulk particles on redox-enzymes of the *Punica granatum* callus. *Sci. Rep.* 10, 19722. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76664-4>
- Farhadi-Khouzani, M., Fereshteh, Z., Loghman-Estarki, M.R., Razavi, R.S., 2012. Different morphologies of ZnO nanostructures via polymeric complex sol-gel method: Synthesis and characterization. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 64, 193–199. <https://doi.org/10.1007/s10971-012-2847-y>
- Flores-Villaseñor, S.E., Peralta-Rodríguez, R.D., Ramirez-Contreras, J.C., Cortes-

- Mazatán, G.Y., Estrada-Ramírez, A.N., 2016. Biocompatible microemulsions for the nanoencapsulation of essential oils and nutraceuticals, en: *Encapsulations*. Elsevier, pp. 503–558. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804307-3.00012-0>
- Gallego-Giraldo, L., Shadle, G., Shen, H., Barros-Rios, J., Fresquet Corrales, S., Wang, H., Dixon, R.A., 2016. Combining enhanced biomass density with reduced lignin level for improved forage quality. *Plant Biotechnol. J.* 14, 895–904. <https://doi.org/10.1111/pbi.12439>
- Gangloff, W.J., Westfall, D.G., Peterson, G.A., Mortvedt, J.J., 2006. Mobility of organic and inorganic zinc fertilizers in soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 37, 199–209. <https://doi.org/10.1080/00103620500403200>
- García-Gómez, C., Fernández, M.D., 2019. Impacts of metal oxide nanoparticles on seed germination, plant growth and development, en: *Comprehensive Analytical Chemistry*. pp. 75–124. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.007>
- García-Gómez, C., García, S., Obrador, A.F., González, D., Babín, M., Fernández, M.D., 2018a. Effects of aged ZnO NPs and soil type on Zn availability, accumulation and toxicity to pea and beet in a greenhouse experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 160, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.019>
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., Fernández, M.D., 2018b. Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown in a calcareous soil and an acidic soil. *Sci. Total Environ.* 644, 770–780. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.356>
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., Fernández, M.D., 2017. Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO<sub>4</sub> in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Sci. Total Environ.* 589, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.153>
- García-López, J.I., Zavala-García, F., Olivares-Saénz, E., Lira-Saldivar, R.H., Barriga-Castro, E.D., Ruiz-Torres, N.A., Ramos-Cortez, E., Vázquez-Alvarado, R., Niño-Medina, G., 2018. Zinc Oxide nanoparticles boosts phenolic compounds and antioxidant activity of capsicum annum l. during germination. *Agronomy* 8, 215. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100215>
- Geilfus, C.-M., 2019. Intercropping, en: *Controlled Environment Horticulture*. Springer International Publishing, Cham, pp. 175–185. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23197-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23197-2_16)
- Gómez, S., Torres, V., Medina, Y., Rodríguez, Y., Sardiñas, Y., Herrera, M., Rodríguez, R., 2019. Application of the linear mixed and generalized mixed model as alternatives for analysis in experiments with repeated measures. *Cuba. J. Agric. Sci.* 53, 7–12.
- Hafeez, B., 2013. Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *Am. J. Exp. Agric.* 3, 374–391. <https://doi.org/10.9734/ajea/2013/2746>
- Hassan, N.M., Yusof, N.A., Yahaya, A.F., Rozali, N.N.M., Othman, R., 2019. Carotenoids of capsicum fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants* 8, 469. <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
- Henini, M., 2000. Scanning electron microscopy: An introduction. *III-Vs Rev.* 13, 40–44. [https://doi.org/10.1016/S0961-1290\(00\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X)
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil THE COLLEGE OF AGRICULTURE. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347, 1–32.
- IBM, 2019. SPSS Software | IBM. IBM website.
- Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z., Oraghi Ardebili, N., Ghoranneviss, M., Safari, N., 2018. Cold plasma relieved toxicity signs of nano zinc oxide in *Capsicum annum* cayenne via modifying growth, differentiation, and physiology. *Acta Physiol. Plant.* 40, 1–11.

- <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2730-8>
- Israel García-López, J., Lira-Saldivar, R.H., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Niño-Medina, G., Angélica Ruiz-Torres, N., Méndez-Argüello, B., Díaz-Barriga, E., 2018. Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*. *Toxicol. Environ. Chem.* 100, 560–572. <https://doi.org/10.1080/02772248.2018.1550781>
- ISTA, 2016. Full Issue. *Int. Rules Seed Test.* 2016, 1–384. <https://doi.org/10.15258/istarules.2016.f>
- Karlsson, H.L., Toprak, M.S., Fadeel, B., 2015. Toxicity of Metal and Metal Oxide Nanoparticles, en: *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition*. Elsevier, pp. 75–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00004-4>
- Kaur, H., Garg, N., 2021. Zinc toxicity in plants: a review. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03642-z>
- Kaya, C., Ashraf, M., Akram, N.A., 2018. Hydrogen sulfide regulates the levels of key metabolites and antioxidant defense system to counteract oxidative stress in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants exposed to high zinc regime. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 12612–12618. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1510-8>
- Kaygili, O., Ercan, I., Ates, T., Keser, S., Orek, C., Gunduz, B., Seckin, T., Bulut, N., Bañares, L., 2018. An experimental and theoretical investigation of the structure of synthesized ZnO powder. *Chem. Phys.* 513, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2018.08.021>
- Khan, H., Ayub, C., Pervez, M., Bilal, R.M., Shahid, M., Zaif, K., 2009. Effect of seed priming with NaCl on salinity tolerance of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) at seedling stage. *Soil Environ.* 28, 81–87. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00074-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00074-4)
- Kim, S., Park, M., Yeom, S.I., Kim, Y.M., Lee, J.M., Lee, H.A., Seo, E., Choi, J., Cheong, K., Kim, K.T., Jung, K., Lee, G.W., Oh, S.K., Bae, C., Kim, S.B., Lee, H.Y., Kim, S.Y., Kim, M.S., Kang, B.C., Jo, Y.D., Yang, H.B., Jeong, H.J., Kang, W.H., Kwon, J.K., Shin, C., Lim, J.Y., Park, J.H., Huh, J.H., Kim, J.S., Kim, B.D., Cohen, O., Paran, I., Suh, M.C., Lee, S.B., Kim, Y.K., Shin, Y., Noh, S.J., Park, J., Seo, Y.S., Kwon, S.Y., Kim, H.A., Park, J.M., Kim, H.J., Choi, S.B., Bosland, P.W., Reeves, G., Jo, S.H., Lee, B.W., Cho, H.T., Choi, H.S., Lee, M.S., Yu, Y., Do Choi, Y., Park, B.S., Van Deynze, A., Ashrafi, H., Hill, T., Kim, W.T., Pai, H.S., Ahn, H.K., Yeam, I., Giovannoni, J.J., Rose, J.K.C., Sørensen, I., Lee, S.J., Kim, R.W., Choi, I.Y., Choi, B.S., Lim, J.S., Lee, Y.H., Choi, D., 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat. Genet.* 46, 270–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877>
- Kochhar, S.L., Gujral, S.K., 2020. *Plant Physiology, Science progress*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108486392>
- Kohli, R.R., Mittal, K.L., 2019. Developments in surface contamination and cleaning, volume 12: Methods for assessment and verification of cleanliness of surfaces and characterization of surface contaminants, *Developments in Surface Contamination and Cleaning, Volume 12: Methods for Assessment and Verification of Cleanliness of Surfaces and Characterization of Surface Contaminants*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03847-8>
- Kong, L., Wen, Y., Jiao, X., Liu, X., Xu, Z., 2021. Interactive regulation of light quality and temperature on cherry tomato growth and photosynthesis. *Environ. Exp. Bot.* 182, 104326. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104326>
- Kopittke, P.M., Lombi, E., Wang, P., Schjoerring, J.K., Husted, S., 2019. Nanomaterials as

- fertilizers for improving plant mineral nutrition and environmental outcomes. *Environ. Sci. Nano* 6, 3513–3524. <https://doi.org/10.1039/c9en00971j>
- Kouhi, S.M.M., Lahouti, M., Ganjeali, A., Entezari, M.H., 2015. Comparative Effects of ZnO Nanoparticles, ZnO Bulk Particles, and Zn<sup>2+</sup> on Brassica napus after Long-Term Exposure: Changes in Growth, Biochemical Compounds, Antioxidant Enzyme Activities, and Zn Bioaccumulation. *Water. Air. Soil Pollut.* 226, 364. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2628-7>
- Kristo, M.J., 2012. Nuclear Forensics, en: *Handbook of Radioactivity Analysis*. Elsevier, pp. 1281–1304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384873-4.00021-9>
- Kumar, A., Dixit, C.K., 2017. Methods for characterization of nanoparticles, en: *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*. Elsevier, pp. 44–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>
- Kumar, A., Kumar, J., 2008a. Defect and adsorbate induced infrared modes in sol-gel derived magnesium oxide nano-crystallites. *Solid State Commun.* 147, 405–408. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2008.06.014>
- Kumar, A., Kumar, J., 2008b. On the synthesis and optical absorption studies of nano-size magnesium oxide powder. *J. Phys. Chem. Solids* 69, 2764–2772. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2008.06.143>
- Labille, J., Brant, J., 2010. Stability of nanoparticles in water. *Nanomedicine* 5, 985–998. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.62>
- Lahive, E., O' Halloran, J., Jansen, M.A.K., 2011. Differential sensitivity of four Lemnaceae species to zinc sulphate. *Environ. Exp. Bot.* 71, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.014>
- Landy N., 2012. Evaluation of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, carcass characteristics, some of the immune responses, and serum biochemical parameters of broiler chicks. *J. Med. Plants Res.* 6, 510–515. <https://doi.org/10.5897/jmpr11.1371>
- Lee, S.Y., Rhie, Y.H., Kim, K.S., 2018. Dormancy breaking and germination requirements of seeds of *Thalictrum uchiyamae* (Ranunculaceae) with underdeveloped embryos. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 231, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.004>
- Lim, T.K., 2013. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits, en: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits*. pp. 1–943. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5653-3>
- Liu, R., Lal, R., 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Sci. Rep.* 4, 5686. <https://doi.org/10.1038/srep05686>
- Liu, W., Zeb, A., Lian, J., Wu, J., Xiong, H., Tang, J., Zheng, S., 2020. Interactions of metal-based nanoparticles (Mbnps) and metal-oxide nanoparticles (monps) with crop plants: A critical review of research progress and prospects. *Environ. Rev.* 28, 294–310. <https://doi.org/10.1139/er-2019-0085>
- Long, X.X., Yang, X.E., Ni, W.Z., Ye, Z.Q., He, Z.L., Calvert, D. V., Stoffella, J.P., 2003. Assessing zinc thresholds for phytotoxicity and potential dietary toxicity in selected vegetable crops. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34, 1421–1434. <https://doi.org/10.1081/CSS-120020454>
- Luo, X.J., Peng, J., Li, Y.J., 2011. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.074>
- Lv, J., Zhang, S., Luo, L., Zhang, J., Yang, K., Christied, P., 2015. Accumulation, speciation and uptake pathway of ZnO nanoparticles in maize. *Environ. Sci. Nano* 2, 68–77. <https://doi.org/10.1039/c4en00064a>
- Lv, Z., Sun, H., Du, W., Li, R., Mao, H., Kopittke, P.M., 2021. Interaction of different-sized

- ZnO nanoparticles with maize (*Zea mays*): Accumulation, biotransformation and phytotoxicity. *Sci. Total Environ.* 796, 148927. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148927>
- Macnicol, R.D., Beckett, P.H.T., 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil* 85, 107–129. <https://doi.org/10.1007/BF02197805>
- Madhusudanan, M., Singh, K., Ramawat, N., 2019. Evaluation of the effectiveness of zinc oxide nano particles on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Res. Crop.* 20, 468–476. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2019.067>
- MADR - Agronet, 2021. Evaluaciones agropecuarias: estadístico del sector agropecuario [WWW Document]. URL <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=59> (consultado 1.17.21).
- Marschner, P., 2011. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition, Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>
- Martino, P., Allia, P., Chiolerio, A., 2016. Nanoparticles, en: *Encyclopedia of Nanotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 2568–2578. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9780-1\\_236](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9780-1_236)
- Mazaheri Tirani, M., Madadkar Haghjou, M., Ismaili, A., 2019. Hydroponic grown tobacco plants respond to zinc oxide nanoparticles and bulk exposures by morphological, physiological and anatomical adjustments. *Funct. Plant Biol.* 46, 360. <https://doi.org/10.1071/FP18076>
- McBeath, T.M., McLaughlin, M.J., 2014. Efficacy of zinc oxides as fertilisers. *Plant Soil* 374, 843–855. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1919-2>
- Medina-Velo, I.A., Barrios, A.C., Zuverza-Mena, N., Hernandez-Viezcas, J.A., Chang, C.H., Ji, Z., Zink, J.I., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2017. Comparison of the effects of commercial coated and uncoated ZnO nanomaterials and Zn compounds in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *J. Hazard. Mater.* 332, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.008>
- Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I., Mendoza-Mendoza, E., García-Cerda, L., Puente-Urbina, B., Lira-Saldívar, R., 2016. Growth promotion of *Capsicum annum* plants by zinc oxide nanoparticles. *Nov. Sci.* 8, 140–156.
- Mengel, K., Kirby, E.A., 2000. *Principios de Nutrición Vegetal*, 4a ed. International Potash Institute, Basilea, Suiza.
- Minagricultura, 2020. Cadena de las Hortalizas [WWW Document]. Dir. Cadenas Agrícolas y For. URL <https://sioc.minagricultura.gov.co/Hortalizas/Documentos/2020-06-30/Cifras sectoriales.pdf> (consultado 1.17.21).
- Moghaddasi, S., Fotovat, A., Khoshgoftarmansh, A.H., Karimzadeh, F., Khazaei, H.R., Khorassani, R., 2017. Bioavailability of coated and uncoated ZnO nanoparticles to cucumber in soil with or without organic matter. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144, 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.074>
- Mohamed, A.-M.O., Paleologos, E.K., 2018. Emerging Pollutants: Fate, Pathways, and Bioavailability, en: *Fundamentals of Geoenvironmental Engineering*. Elsevier, pp. 327–358. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804830-6.00010-7>
- Molnár, Á., Papp, M., Zoltán Kovács, D., Bélteky, P., Oláh, D., Feigl, G., Szöllősi, R., Rázga, Z., Ördög, A., Erdei, L., Rónavári, A., Kónya, Z., Kolbert, Z., 2020. Nitro-oxidative signalling induced by chemically synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in Brassica species. *Chemosphere* 251, 126419. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126419>



- Mosquera-Sánchez, L.P., Arciniegas-Grijalba, P.A., Patiño-Portela, M.C., Guerra-Sierra, B.E., Muñoz-Florez, J.E., Rodríguez-Páez, J.E., 2020. Antifungal effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on *Colletotrichum* sp., causal agent of anthracnose in coffee crops. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 25, 101579. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101579>
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Nair, P.M.G., Chung, I.M., 2017. Regulation of morphological, molecular and nutrient status in *Arabidopsis thaliana* seedlings in response to ZnO nanoparticles and Zn ion exposure. *Sci. Total Environ.* 575, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.017>
- Nasrollahzadeh, M., Issaabadi, Z., Sajjadi, M., Sajadi, S.M., Atarod, M., 2019. Types of Nanostructures, en: *Interface Science and Technology*. Elsevier B.V., pp. 29–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00002-X>
- Navarro-León, E., Albacete, A., Romero, L., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2016. Response of carboxylate metabolism to zinc deficiency in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 179, 758–764. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600473>
- Nemček, L., Šebesta, M., Urík, M., Bujdoš, M., Dobročka, E., Vávra, I., 2020. Impact of bulk zno, zno nanoparticles and dissolved zn on early growth stages of barley—a pot experiment. *Plants* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants9101365>
- Neto, M.E., Britt, D.W., Lara, L.M., Cartwright, A., Dos Santos, R.F., Inoue, T.T., Batista, M.A., 2020. Initial development of corn seedlings after seed priming with nanoscale synthetic zinc oxide. *Agronomy* 10, 307. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020307>
- Nieto-Garibay, M., Troyo-Diéguez, A., García-Hernández, E., Murillo-Amador, J.L., Ruiz-Espinoza, B., Higinio, F., Pimienta-Barrsi, ;, 2009. Efecto del estrés hídrico edáfico en emergencia y desarrollo de plántula en las especies de chile *Capsicum frutescens* L. Y *Capsicum annuum* L. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 10, 405–413.
- Niklas, K.J., Enquist, B.J., 2001. Invariant scaling relationships for interspecific plant biomass production rates and body size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2922–2927. <https://doi.org/10.1073/pnas.041590298>
- Ochoa, Y., Ortigón, Y., Vargas, M., Rodríguez Páez, J.E., 2009. Síntesis de TiO<sub>2</sub>, fase anatasa, por el método Pechini. *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.* 3, 931–937.
- OECD, 2006. Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, Guidelines for the Testing of Chemicals, Terrestrial Plant Test Seedling Emergence and Seedling Growth Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264070066-en>
- Olatunji, T.L., Afolayan, A.J., 2018. The suitability of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) for alleviating human micronutrient dietary deficiencies: A review. *Food Sci. Nutr.* 6, 2239–2251. <https://doi.org/10.1002/fsn3.790>
- Ong, C.B., Ng, L.Y., Mohammad, A.W., 2018. A review of ZnO nanoparticles as solar photocatalysts: Synthesis, mechanisms and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 81, 536–551. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.020>
- Origin, 2020. Origin: Data Analysis and Graphing Software. *Orig. Orig. Introd.* .
- Osman, H.E., Al-Jabri, M., El-Ghareeb, D.K., Al-Marouai, Y.A., 2020. Impact of aluminum and zinc oxides on morphological characters, germination, metals accumulation and DNA in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 19, 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.09.004>
- Pechini, M.P., 1967. Method of Preparing Lead and Alkaline Earth Titanates and Niobates

- and Coating Method Using the Same To Form a Capacitor. *Claims*. 434, 117–215.
- Peralta-Videa, J.R., Hernandez-Viezcas, J.A., Zhao, L., Diaz, B.C., Ge, Y., Priester, J.H., Holden, P.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Cerium dioxide and zinc oxide nanoparticles alter the nutritional value of soil cultivated soybean plants. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.028>
- Pereira-Dias, L., Gil-Villar, D., Castell-Zeising, V., Quiñones, A., Calatayud, Á., Rodríguez-Burruezo, A., Fita, A., 2020. Main Root Adaptations in Pepper Germplasm (*Capsicum* spp.) to Phosphorus Low-Input Conditions. *Agronomy* 10, 637. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050637>
- Pichardo-González, J.M., Guevara-Olvera, L., Couoh-Uicab, Y.L., González-Cruz, L., Bernardino-Nicanor, A., Medina, H.R., González-Chavira, M.M., Acosta-García, G., 2018. Efecto de las giberelinas en el rendimiento de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.). *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 9, 925–934. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i5.1502>
- Plaksenkova, I., Kokina, I., Petrova, A., Jermajonoka, M., Gerbreders, V., Krasovska, M., 2020. The impact of zinc oxide nanoparticles on cytotoxicity, genotoxicity, and mirna expression in barley (*hordeum vulgare* L.) seedlings. *Sci. World J.* 2020, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2020/6649746>
- Prasad, T.N.V.K.V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Raja Reddy, K., Sreeprasad, T.S., Sajanalal, P.R., Pradeep, T., 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J. Plant Nutr.* 35, 905–927. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>
- Priester, J.H., Moritz, S.C., Espinosa, K., Ge, Y., Wang, Y., Nisbet, R.M., Schimel, J.P., Susana Goggi, A., Gardea-Torresdey, J.L., Holden, P.A., 2017. Damage assessment for soybean cultivated in soil with either CeO<sub>2</sub> or ZnO manufactured nanomaterials. *Sci. Total Environ.* 579, 1756–1768. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.149>
- Rai-Kalal, P., Jajoo, A., 2021. Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiol. Biochem.* 160, 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.032>
- Raja, K., Sowmya, R., Sudhagar, R., Moorthy, P.S., Govindaraju, K., Subramanian, K.S., 2019. Biogenic ZnO and Cu nanoparticles to improve seed germination quality in blackgram (*Vigna mungo*). *Mater. Lett.* 235, 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.10.038>
- Rajisha, K.R., Deepa, B., Pothan, L.A., Thomas, S., 2011. Thermomechanical and spectroscopic characterization of natural fibre composites, en: *Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance*. Elsevier, pp. 241–274. <https://doi.org/10.1533/9780857092281.2.241>
- Rajneesh, Pathak, J., Singh, V., Kumar, D., Singh, S.P., Sinha, R.P., 2018. DNA in Nanotechnology: Approaches and Developments, en: *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*. Elsevier, pp. 79–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811487-2.00004-9>
- Rajput, V., Minkina, T., Mazarji, M., Shende, S., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Burachevskaya, M., Chaplygin, V., Singh, A., Jatav, H., 2020a. Accumulation of nanoparticles in the soil-plant systems and their effects on human health. *Ann. Agric. Sci.* 65, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.08.001>
- Rajput, V., Minkina, T., Sushkova, S., Behal, A., Maksimov, A., Blicharska, E., Ghazaryan, K., Movsesyan, H., Barsova, N., 2020b. ZnO and CuO nanoparticles: a threat to soil organisms, plants, and human health. *Environ. Geochem. Health* 42, 147–158. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00317-3>

- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.N., Biswas, P., 2015. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics* 7, 1584–1594. <https://doi.org/10.1039/c5mt00168d>
- Ramírez, B., Goyes, R., 2004. *Botánica. Generalidades, Morfología y Anatomía de plantas superiores*, 1a ed, Universidad del Cauca. Popayán, Cauca.
- Rawashdeh, R.Y., Harb, A.M., AlHasan, A.M., 2020. Biological interaction levels of zinc oxide nanoparticles; lettuce seeds as case study. *Heliyon* 6, e03983. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03983>
- Reddy Pullagurala, V.L., Adisa, I.O., Rawat, S., Kim, B., Barrios, A.C., Medina-Velo, I.A., Hernandez-Viezcas, J.A., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2018. Finding the conditions for the beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants-A review. *Environ. Pollut.* 241, 1175–1181. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.036>
- Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2011. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3485–3498. <https://doi.org/10.1021/jf104517j>
- Rizwan, M., Ali, S., Zia ur Rehman, M., Adrees, M., Arshad, M., Qayyum, M.F., Ali, L., Hussain, A., Chatha, S.A.S., Imran, M., 2019. Alleviation of cadmium accumulation in maize (*Zea mays* L.) by foliar spray of zinc oxide nanoparticles and biochar to contaminated soil. *Environ. Pollut.* 248, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.031>
- Robson, A.D., 1993. *Zinc in Soils and Plants*, Zinc in Soils and Plants. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0878-2>
- Roco, M.C., 2011. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J. Nanoparticle Res.* 13, 427–445. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0192-z>
- Rose, R.J., 2017. *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b20316>
- Rout, G.R., Das, P., 2009. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc, en: *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 873–884. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8\\_53](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_53)
- Sadasivam, N., Periakaruppan, R., Sivaraj, R., 2018. Lantana aculeata L.-mediated zinc oxide Nanoparticle-induced DNA damage in *Sesamum indicum* and their cytotoxic activity against siha cell line, en: *Phytotoxicity of Nanoparticles*. Springer International Publishing, Cham, pp. 347–366. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76708-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76708-6_15)
- Samaranayake, P., Liang, W., Chen, Z.H., Tissue, D., Lan, Y.C., 2020. Sustainable protected cropping: A case study of seasonal impacts on greenhouse energy consumption during capsicum production. *Energies* 13, 4468. <https://doi.org/10.3390/en13174468>
- Savassa, S.M., Duran, N.M., Rodrigues, E.S., De Almeida, E., Van Gestel, C.A.M., Bompadre, T.F.V., De Carvalho, H.W.P., 2018. Effects of ZnO Nanoparticles on *Phaseolus vulgaris* Germination and Seedling Development Determined by X-ray Spectroscopy. *ACS Appl. Nano Mater.* 1, 6414–6426. <https://doi.org/10.1021/acsnm.8b01619>
- Scott, N.R., Chen, H., Cui, H., 2018. Nanotechnology Applications and Implications of Agrochemicals toward Sustainable Agriculture and Food Systems. *J. Agric. Food Chem.* 66, 6451–6456. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00964>
- Sellare, J., Meemken, E.M., Qaim, M., 2020. Fairtrade, Agrochemical Input Use, and

- Effects on Human Health and the Environment. *Ecol. Econ.* 176, 106718. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2020.106718>
- Seydmohammadi, Z., Roein, Z., Rezvanipour, S., 2020. Accelerating the growth and flowering of *Eustoma grandiflorum* by foliar application of nano-ZnO and nano-CaCO<sub>3</sub>. *Plant Physiol. Reports* 25, 140–148. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00473-9>
- Sheteiwy, M.S., Fu, Y., Hu, Q., Nawaz, A., Guan, Y., Li, Z., Huang, Y., Hu, J., 2016. Seed priming with polyethylene glycol induces antioxidative defense and metabolic regulation of rice under nano-ZnO stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 19989–20002. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7170-7>
- Singh, A., Singh, N.B., Afzal, S., Singh, T., Hussain, I., 2018. Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *J. Mater. Sci.* 53, 185–201. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1544-1>
- Singh, D., Kumar, A., 2018. Investigating long-term effect of nanoparticles on growth of *Raphanus sativus* plants: a trans-generational study. *Ecotoxicology* 27, 23–31. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1867-3>
- Singh, D., Kumar, A., 2016. Impact of Irrigation Using Water Containing CuO and ZnO Nanoparticles on Spinach oleracea Grown in Soil Media. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 548–553. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1872-x>
- Singh, R.P., Handa, R., Manchanda, G., 2021. Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity. *J. Control. Release* 329, 1234–1248. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.051>
- Singh, V., Singh, S., Tripathi, D., Prasad, S., 2021. *Plant Responses to Nanomaterials, Nanotechnology in the Life Sciences*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-36740-4>
- Smart, R.E., Bingham, G.E., 1974. Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiol.* 53, 258–260. <https://doi.org/10.1104/pp.53.2.258>
- Srikant, V., Clarke, D.R., 1998. On the optical band gap of zinc oxide. *J. Appl. Phys.* 83, 5447–5451. <https://doi.org/10.1063/1.367375>
- Stankic, S., Sternig, A., Finocchi, F., Bernardi, J., Diwald, O., 2010. Zinc oxide scaffolds on MgO nanocubes. *Nanotechnology* 21, 355603. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/35/355603>
- Stanton, C., Sanders, D., Krämer, U., Podar, D., 2022. Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification. *Mol. Plant.* <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.008>
- States, U., Substances, T., 1996. *Ecological Effects Test Guidelines Early Seedling Growth Toxicity Test*.
- Sturikova, H., Krystofova, O., Huska, D., Adam, V., 2018. Zinc, zinc nanoparticles and plants. *J. Hazard. Mater.* 349, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.040>
- Su, Y., Ashworth, V., Kim, C., Adeleye, A.S., Rolshausen, P., Roper, C., White, J., Jassby, D., 2019. Delivery, uptake, fate, and transport of engineered nanoparticles in plants: A critical review and data analysis. *Environ. Sci. Nano* 6, 2311–2331. <https://doi.org/10.1039/c9en00461k>
- Sunde, T.O.L., Grande, T., Einarsrud, M.-A., 2016. Modified Pechini Synthesis of Oxide Powders and Thin Films, en: *Handbook of Sol-Gel Science and Technology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–30. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19454-7\\_130-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19454-7_130-1)
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, M.I., Murphy, A., 2015. *Plant Physiology and Development*, 6a

- ed, Sinauer Associates Incorporated. Sinauer Associates Incorporated, Sunderland.
- Tanzi, M.C., Farè, S., Candiani, G., 2019. Techniques of Analysis, en: Foundations of Biomaterials Engineering. Elsevier, pp. 393–469. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101034-1.00007-4>
- Tao, H., Hu, S., Xia, C., Wang, M., Wang, T., Zeng, W., Li, Y., Chen, H., Zheng, J., Wang, Q., 2021. Involvement of glucosinolates in the resistance to zinc oxide nanoparticle-induced toxicity and growth inhibition in: Arabidopsis. *Environ. Sci. Process. Impacts* 23, 1040–1049. <https://doi.org/10.1039/d1em00134e>
- Thounaojam, T.C., Meetei, T.T., Devi, Y.B., Panda, S.K., Upadhyaya, H., 2021. Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs): a promising nanoparticle in renovating plant science. *Acta Physiol. Plant.* <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03307-0>
- Tripathi, D.K., Sharma, S., Dubey, N.K., Ahmad, P., Chauhan, D.K., 2018. Nanomaterials in plants, algae and microorganisms: Concepts and controversies: Volume 2, Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms: Concepts and Controversies: Volume 2. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-00175-4>
- Tymoszuk, A., Wojnarowicz, J., 2020. Zinc oxide and zinc oxide nanoparticles impact on in vitro germination and seedling growth in allium cepa L. *Materials (Basel)*. 13, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma13122784>
- Umar, W., Hameed, M.K., Aziz, T., Maqsood, M.A., Bilal, H.M., Rasheed, N., 2020. Synthesis, characterization and application of ZnO nanoparticles for improved growth and Zn biofortification in maize. *Arch. Agron. Soil Sci.* 67, 1–13. <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1782893>
- Vargas, M.A., Rivera-Muñoz, E.M., Diosa, J.E., Mosquera, E.E., Rodríguez-Páez, J.E., 2021. Nanoparticles of ZnO and Mg-doped ZnO: Synthesis, characterization and efficient removal of methyl orange (MO) from aqueous solution. *Ceram. Int.* 47, 15668–15681. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.02.137>
- Verma, K.K., Song, X.-P., Joshi, A., Tian, D.-D., Rajput, V.D., Singh, M., Arora, J., Minkina, T., Li, Y.-R., 2022. Recent Trends in Nano-Fertilizers for Sustainable Agriculture under Climate Change for Global Food Security. *Nanomaterials* 12, 173. <https://doi.org/10.3390/nano12010173>
- Wan, J., Wang, Ruting, Wang, Ruling, Ju, Q., Wang, Y., Xu, J., 2019. Comparative Physiological and Transcriptomic Analyses Reveal the Toxic Effects of ZnO Nanoparticles on Plant Growth. *Environ. Sci. Technol.* 53, 4235–4244. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06641>
- Wilson, A., Norden, N., 2015. The R Project for Statistical Computing The R Project for Statistical Computing [WWW Document]. URL <http://www.r-project.org/254>. URL <https://www.r-project.org/> (consultado 7.22.21).
- Xu, J., Luo, X., Wang, Y., Feng, Y., 2018. Evaluation of zinc oxide nanoparticles on lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and soil bacterial community. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 6026–6035. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0953-7>
- Yang, G., Yuan, H., Ji, H., Liu, H., Zhang, Y., Wang, G., Chen, L., Guo, Z., 2021. Effect of ZnO nanoparticles on the productivity, Zn biofortification, and nutritional quality of rice in a life cycle study. *Plant Physiol. Biochem.* 163, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.053>
- Yang, Y., Ma, C., Xu, Y., Wei, Q., Imtiaz, M., Lan, H., Gao, S., Cheng, L., Wang, M., Fei, Z., Hong, B., Gao, J., 2014. A zinc finger protein regulates flowering time and abiotic stress tolerance in chrysanthemum by modulating gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 26, 2038–2054. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124867>
- Yoon, S.J., Kwak, J. II, Lee, W.M., Holden, P.A., An, Y.J., 2014. Zinc oxide nanoparticles

- delay soybean development: A standard soil microcosm study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.014>
- Younes, N.A., Hassan, H.S., Elkady, M.F., Hamed, A.M., Dawood, M.F.A., 2020. Impact of synthesized metal oxide nanomaterials on seedlings production of three Solanaceae crops. *Heliyon* 6, e03188. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03188>
- Youssef, M.S., Elamawi, R.M., 2020. Evaluation of phytotoxicity, cytotoxicity, and genotoxicity of ZnO nanoparticles in *Vicia faba*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 18972–18984. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3250-1>
- Yurdakal, S., Garlisi, C., Özcan, L., Bellardita, M., Palmisano, G., 2019. (Photo)catalyst characterization techniques: Adsorption isotherms and BET, SEM, FTIR, UV-Vis, photoluminescence, and electrochemical characterizations, en: *Heterogeneous Photocatalysis: Relationships with Heterogeneous Catalysis and Perspectives*. Elsevier, pp. 87–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64015-4.00004-3>
- Zafar, H., Abbasi, B.H., Zia, M., 2019. Physiological and antioxidative response of *Brassica nigra* (L.) to ZnO nanoparticles grown in culture media and soil. *Toxicol. Environ. Chem.* 101, 281–299. <https://doi.org/10.1080/02772248.2019.1691555>
- Zafar, H., Ali, A., Ali, J.S., Haq, I.U., Zia, M., 2016. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: Growth dynamics and antioxidative response. *Front. Plant Sci.* 7, 535. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00535>
- Zafar, H., Aziz, T., Khan, B., Mannan, A., Rehman, R.U., Zia, M., 2020. CuO and ZnO Nanoparticle Application in Synthetic Soil Modulates Morphology, Nutritional Contents, and Metal Analysis of *Brassica nigra*. *ACS Omega* 5, 13566–13577. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00030>
- Zeb, A., Liu, W., Wu, J., Lian, J., Lian, Y., 2021. Knowledge domain and emerging trends in nanoparticles and plants interaction research: A scientometric analysis. *NanoImpact* 21, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100278>