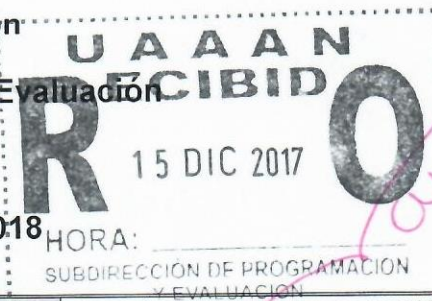






Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Botánica
Tema estratégico (ANA/PEP):		Hacer más eficiente la aplicación de fertilizantes foliares mediante biomoléculas y nanotecnología			
Línea de investigación:		Sistemas de producción en la agricultura protegida			
Título del proyecto: Nanopartículas de Silicio para incrementar los compuestos bioactivos y mejorar la tolerancia a estrés en Hortalizas					
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)		\$75,000	El proyecto es:		Nuevo <input type="checkbox"/> Continuidad <input checked="" type="checkbox"/>
Tipo de investigación:		Básica <input type="checkbox"/>	Aplicada <input type="checkbox"/>	Tecnológica <input checked="" type="checkbox"/>	e-mail del responsable: juma841025@hotmail.com
Vinculación:		Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	X Fondos concurrentes: <input type="checkbox"/>	
Cooperante(s):					
Entidad (es):		Coahuila	Municipio (s):		Saltillo
Localidades:					
A realizar durante el(los) año(s):		2018-2020			
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)		Expediente No.	
Responsable		Dr. Antonio Juárez Maldonado		Botánica 4103	
Colaborador:		Dra. Susana González Morales		Conacyt-UAAAN 100062	
Colaborador:		Dr. Adalberto Benavides Mendoza		Horticultura 3303	
Colaborador:		Dra. Alma Delia Hernández Fuentes		UAEH	
Colaborador:		Dra. Hortensia Ortega Ortíz		CIQA	
Colaborador:		Dr. Gregorio Cadenas Pliego		CIQA	
		Grado por obtener		Matrícula	
Tesista:		Zeus H. Pinedo Guerrero		Doctorado 61151350	
Programa Docente:		Doctorado en Agricultura Protegida			
Tesista:		Claudia Ariana Pliego Zuñiga		Maestría 41120445	
Programa Docente:		Maestría en Ciencias en Horticultura			
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello		Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"  			
Nombre		Dra. Silvia Yudith Martínez Amador Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación	

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Depto. de Botánica

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Nanopartículas de Silicio para incrementar los compuestos bioactivos y mejorar la tolerancia a estrés en Hortalizas	75,000
---	--------

2.- Introducción

Hoy en día, el uso de nanopartículas (NPs) en la agricultura es cada vez más promisorio. Si bien faltan datos acerca de la evaluación de su toxicidad (Anarayanan *et al.*, 2013), existen cada vez más estudios que presentan resultados satisfactorios en los cultivos. Una de las ventajas de las NPs es que pueden ser más tóxicas y/o beneficiosas en comparación a los materiales a granel. Esto es debido a que tienen la capacidad potencial de pasar la membrana celular de la planta debido a su pequeño tamaño (hasta 100 nm) (Adhikari *et al.*, 2013). Algunos trabajos de investigación han demostrado que las NPs Cu por ejemplo, se depositan en las células de la raíz y hoja, y otros tejidos de la planta (Shi *et al.*, 2014). Estas NPs también incrementan la actividad de algunas enzimas como catalasa (CAT) (Trujillo-Reyes *et al.*, 2014). En plántulas de soya y garbanzo se obtuvo mayor crecimiento con 100 y 60 ppm de NPs Cu (Adhikari *et al.*, 2012). Además, al aplicar NPs Cu en tomate se afectaron positivamente las características agronómicas, la actividad de catalasa y el contenido de licopeno en fruto, entre otras (Hernández-Hernández *et al.*, 2017; Juárez-Maldonado *et al.*, 2016). Además, se demostró que la aplicación foliar de NPs Cu indujo una mayor acumulación de compuestos bioactivos en tomate (fenoles, β -caroteno, vitamina C), además de que los mantuvo por más tiempo incluso cuando las plantas se desarrollaron en condiciones de estrés salino (Hernández-Fuentes *et al.*, 2017). En el cultivo de chile jalapeño la aplicación de NPs Cu también incrementó el contenido de compuestos bioactivos en los frutos (flavonoides, fenoles, capsaicina) así como la actividad antioxidante (Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017).

Estos resultados demuestran que el uso de nanopartículas en los cultivos presenta diferentes beneficios que pueden impactar en el desarrollo de la agricultura. Sin embargo, aún se desconocen los efectos de otras nanopartículas no metálicas. Por ejemplo, las NPs SiO₂ han sido reportadas como promotoras de la actividad enzimática SOD y ácido indolacético (IAA) en algodón. Además se demostró que se encuentran presentes en la savia del xilema y raíz, y son transportadas hacia los brotes (Nhan-Le *et al.*, 2014). En arroz se observaron resultados similares con 40 y 5 ppm de NPs de silicio (Adhikari *et al.*, 2013). Sin embargo, más allá de estas concentraciones se inhibe el crecimiento debido a la acumulación y captación de las NPs en las raíces. El silicio, es un elemento benéfico para las plantas, y genera cambios favorables en estas. Se ha demostrado que la aplicación de silicio es benéfica para tolerar estrés abiótico en plantas de tomate, específicamente estrés por deficiencia de agua (Cao *et al.*, 2017). Además, está bien documentada la participación del silicio en la tolerancia al estrés por patógenos (Wang *et al.*, 2017). La aplicación de este elemento genera cambios en las estructuras celulares de las plantas, cambios bioquímicos relacionados con enzimas y antioxidantes que pueden funcionar como compuestos de defensa, y en última instancia cambios a nivel molecular que le confieren a las plantas la capacidad tolerancia contra patógenos (Wang *et al.*, 2017). Considerando las ventajas del uso de NPs, entonces es posible esperar que el silicio en forma de NPs genere más y mejores efectos en las plantas debido a que puede ser más fácilmente absorbido y transportado.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Conocer las respuestas fisiológicas, morfológicas y bioquímicas relacionadas a la inducción de compuestos bioactivos en los frutos y a la tolerancia a diversos tipos de estrés originadas por la aplicación de Nanopartículas de Silicio

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar diferentes concentraciones de NPs-Si en hortalizas para evaluar sus respuestas
- Inducir diversos tipos de estrés biótico y abiótico en hortalizas para determinar si la aplicación de NPs Si

generan efectos positivos

- Evaluar la inducción de compuestos bioactivos en los frutos originada por la aplicación de NPs-Si

Hipótesis

La aplicación de NPs Si incrementará la concentración de compuestos bioactivos en los frutos, además inducirá cambios morfológicos y bioquímicos que se traducirán en tolerancia a diversos tipos de estrés biótico y abiótico en hortalizas

3.-Revisión de Literatura

Nanotecnología

La nanotecnología es un término genérico y en evolución que comprende el desarrollo de muchos productos y procesos, con la característica común de la escala nanométrica. Esta escala va desde 1 nm hasta los 100 nm. Para que una partícula pertenezca a esta escala debe tener dimensiones nanométricas en más de una de sus dimensiones (Nowack y Bucheli, 2007). La nanotecnología se presenta como una nueva área de investigación que permite estudiar fenómenos que ocurren a nivel atómico y molecular, su importancia radica en el mundo nanométrico ya que los materiales pueden adquirir o realizar propiedades diferentes a las que se tienen a escala macroscópica (Mendoza y Rodríguez, 2007). La rápida evolución y crecimiento de la nanotecnología se ha convertido en una pieza clave para el fomento de la innovación competitiva, la aparición de nuevos negocios y perspectivas de progreso para muchos sistemas económicos. Representan una revolución de dispositivos con precisión atómica, a través del tratamiento de átomos y moléculas, teniendo aplicaciones en medicina y diversos tipos de industria como la automoción, textil y alimentaria entre otras (Ávalos *et al.*, 2013). En la actualidad, el inventario de productos para el consumo indica que hay 1814 productos que contienen nanomateriales (Vance *et al.*, 2015). La aplicación de la nanotecnología en los sectores agrícola y alimentario es relativamente reciente en comparación con su uso en la administración de fármacos y en los productos farmacéuticos (García *et al.*, 2010). Al igual que en otros sectores, la nanotecnología promete revolucionar toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el procesamiento y almacenamiento de hortalizas y otros productos (Lili *et al.*, 2011). Estas aplicaciones se están estudiando, desarrollando e incluso utilizando en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos, desde la agricultura, el procesamiento y embalaje de alimentos, los proveedores/minoristas y por último los consumidores (Berekaa, 2015).

Nanopartículas

Las Nanopartículas poseen dimensiones nanométricas en sus tres dimensiones, mientras que los términos material nanoestructurado y nanomaterial son más generales y se aplican a materiales cuya fabricación, o cuyas dimensiones sean controladas a nivel nanométrico. Hay tres tipos de Nanopartículas: las naturales, como las que se producen en erupciones volcánicas; las incidentales, como las emisiones de la combustión en motores; y las fabricadas, generadas a propósito con una finalidad (Medina *et al.*, 2015). Por lo que su diversidad es muy extensa. Estas pueden ser fabricadas a través de dos métodos principales; "top-down" moliendo materiales a granel o "bottom-up" mediante la síntesis química o auto-ensamblaje de compuestos más pequeños (Forough y Farhadi, 2010; Pal *et al.*, 2011). El interés de esta tecnología radica en el hecho de que su pequeño tamaño aporta propiedades físicas y químicas que difieren significativamente de las que presenta el mismo material a mayor escala. Por esta capacidad ventajosa que les otorga este distinto comportamiento, las NPs pueden formar parte de la composición de productos y aportarles nuevas propiedades. Sin embargo, esta diferencia de comportamiento puede igualmente inducir riesgos potenciales (Maurer-Jones *et al.*, 2013). Los NMs inorgánicos constan de metales, principalmente NPs de metales oxidados cuya aplicación mayoritaria consiste en el desarrollo de envasado de alimentos. Entre los metales más usados encontramos las NPs de plata, hierro, calcio y magnesio, selenio, dióxido de silicio y dióxido de titanio (Weir *et al.*, 2012).

Efectos del Silicio

El silicio es el segundo elemento más abundante en la tierra después del oxígeno, y representa hasta un 70 % de la masa del suelo. Este elemento no se considera como esencial para las plantas, sin embargo, es considerado como benéfico para el crecimiento y producción de los cultivos. Se ha demostrado que este elemento puede ser acumulado en las paredes celulares de las plantas, además de activar señales que en última instancia producen tolerancia a

diferentes tipos de estrés. Por ejemplo, se puede mejorar la tolerancia a hongos, bacterias, e incluso a insectos plaga que afectan a los cultivos. Esto derivado de cambios que pueden reforzar las estructuras celulares, activación del sistema de defensa, producción de compuestos antimicrobianos, así como la activación de la expresión de genes relacionados al sistema de defensa. Los cambios estructurales incluyen generación de ceras, cutículas, cambios en las paredes celulares como aumento de grosor. Entre los cambios bioquímicos se incluyen activación de enzimas, producción de compuestos antimicrobianos, o la regulación de los sistemas y vías de señalización celular.

4.- Procedimiento Experimental

El presente trabajo se llevará a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Se utilizará como material experimental plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) híbrido "Vitaly". El cultivo es de hábito de crecimiento indeterminado. Serán establecidas en un invernadero del Departamento de Horticultura en macetas de 4 L, con sustrato peat mos y perlita, proporción 1:1.

El experimento se desarrollara en tres etapas: Etapa I. En esta etapa se determinarán las dosis de nanopartículas de silicio que den mejores resultados en el contenido de biocompuestos y actividad de enzimas. Además se evaluarán las variables agronómicas como altura de la planta, diámetro del tallo, número de racimos por planta, peso fresco de frutos, y finalmente peso fresco y seco de las plantas para conocer el efecto sobre el crecimiento y desarrollo. Se evaluarán tres dosis de NPs-Si (100, 200 y 400 mg/L) aplicados foliarmente. Se incluirán un testigo absoluto y las mismas dosis en forma iónica usando silicato de potasio como fuente de silicio.

En la Etapa II se evaluarán nuevamente las dosis de NPs-Si bajo una condición de estrés salino. Para esto se aplicará NaCl en la solución nutritiva cada vez que esta sea preparada (200 mM de NaCl). En esta etapa nuevamente se evaluarán variables bioquímicas, fisiológicas y agronómicas con el fin de verificar si las NPs-Si inducen tolerancia al estrés salino.

En la Etapa III se evaluarán las dosis de NPs-Si bajo una condición de estrés biótico, originado por un hongo fitopatógeno (cenicilla o mildiú, dependiendo de la disponibilidad de las cepas). En esta etapa además de evaluar las variables bioquímicas, fisiológicas y agronómicas, se evaluará en índice de severidad e incidencia del patógeno. Con esto se podrá verificar si las NPs-Si inducen tolerancia al estrés originado por el patógeno evaluado.

En las tres etapas se determinará la morfología (altura, diámetro de tallo, número de hojas), biomasa fresca y seca, y la micromorfología epidérmica (frecuencia estomática e índice estomático abaxial y adaxial) a los 10, 20 y 40 días después del trasplante (ddt). Adicionalmente el contenido de los minerales será determinado usando un ICP-plasma. Las plantas serán colectadas y serán secadas en horno de secado durante 48 horas a una temperatura de 80 °C. Luego de esto serán molidas y sometidas a digestión ácida para detectar la presencia de los elementos minerales en las plantas tratadas.

Además se medirá en las hojas la acumulación de fenoles, capacidad antioxidante (ABTS y DPPH), vitamina C. Serán determinados utilizando técnicas colorimétricas y HPLC en muestras colectadas de los frutos del tercer corte. Las muestras serán colocadas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C en ultracongelador. La actividad enzimática de catalasa (CAT) será cuantificada con un método espectrofotométrico (Ramos *et al.*, 2010). La cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976). Para la enzima superóxido dismutasa (SOD) la extracción se efectuará por el método establecido por Ramos *et al.* (2010), y la actividad enzimática se determinará mediante el kit de Sigma-Aldrich 19160. La enzima Glutación peroxidasa (GPX) se medirá utilizando el método modificado por Flohé y Günzler (1984) usando H₂O₂ como sustrato.

Para determinar la calidad nutricional de los frutos de pepino se utilizarán muestras de los frutos colectados. Se determinará el índice refractométrico, el pH, el contenido de vitamina C, y carotenoides. También se medirán el diámetro y largo de frutos, y peso promedio de frutos para determinar el rendimiento.

Para el análisis estadístico se realizara un ANOVA y comparación de medias, LSD Fisher ($P \leq 0.05$), en el programa estadístico INFOSTAT.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Desarrollo experimental		X	X	X	X	X	X					
Aplicación de NPs			X	X	X	X	X					
Evaluación de tratamientos				X	X	X	X					
Determinaciones en Laboratorio						X	X	X				
Análisis de datos							X	X	X			
Redacción de 1 manuscrito									X	X		

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Insumos para desarrollo experimental	X	X										
Insumos para determinaciones en Laboratorio		X	X									

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2020
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- 1 Tesis de Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida
- 1 Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura
- 1 Artículo publicado en revista indizada
- 2 Artículos enviados a revistas indizadas
- 2 Tesis de Licenciatura

6.-Literatura Citada

- Ávalos, A, Haza, AI, Mateo, D y Morales P. 2013. Aplicaciones y riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas de plata. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 1-23.
- Berekaa MM. 2015. Nanotechnology in Food Industry; Advances in Food processing, Packaging and Food Safety. Int J Curr Microbiol App Sci, 345-357.
- Cao, B., L. Wang, S. Gao, J. Xia, K. Xu. 2017. Silicon-mediated changes in radial hydraulic conductivity and cell wall stability are involved in silicon-induced drought resistance in tomato. Protoplasma, 254: 2295-2304.
- Forough, M y Farhadi, K. 2010. Biological and green synthesis of silver nanoparticles. Turkish J Eng Env Sci 34: 281-287.
- Hernández-Fuentes, A.D., E.R. López-Vargas, J.M. Pinedo-Espinoza, R.G. Campos-Montiel, J. Valdés-Reyna, A. Juárez-Maldonado. 2017. Postharvest Behavior of Bioactive Compounds in Tomato Fruits Treated with Cu Nanoparticles and NaCl Stress. Applied Science, 7(980): 1-14.
- Hernández-Hernández, H., A. Benavides-Mendoza, H. Ortega-Ortiz, A.D. Hernández-Fuentes, A. Juárez-Maldonado. 2017. Cu Nanoparticles in chitosan-PVA hydrogels as promoters of growth, productivity and fruit quality in tomato. Emirates Journal of Food and Agriculture, 29(8): 573-580.
- Juárez-Maldonado, A., H. Ortega-Ortiz, F. Pérez-Labrada, G. Cadenas-Pliego, A. Benavides-Mendoza. 2016. Cu

Nanoparticles absorbed on chitosan hydrogels positively alter morphological, production, and quality characteristics of tomato. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89: 183-189.

Lili, H., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M. 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research*, 166: 207–215.

Maurer-Jones, MA, Gunsolus, IL, Murphy, CJ y Haynes CL. 2013. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal Chem* 85(6): 3036-3049.

Medina M., Miguel E., Luis E. Galván R. y Rosa E. Reyes G. Las nanopartículas y el medio ambiente. 2015, ISSN 1316-4821, Vol. 19, N° 74.

Mendoza, G. y Rodríguez, J. (2007) La Nanociencia y la Nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos* 29: 161-186.

Nowack, B. y Bucheli, T. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150 (2007): 5-22.

Pinedo-Guerrero, Z.H., A.D. Hernández-Fuentes, H. Ortega-Ortiz, A. Benavides-Mendoza, G. Cadenas-Pliego, A. Juárez-Maldonado. 2017. Cu Nanoparticles in Hydrogels of Chitosan-PVA Affects the Characteristics of Post-Harvest and Bioactive Compounds of Jalapeño Pepper. *Molecules*, 22(926): 1-14.

Vance, ME, Kuiken, T, Vejerano, EP, McGinnis, SP, Hochella, MF, Rejeski, D y Hull MS. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6:1769-1780.

Wang, M., L. Gao, S. Dong, Y. Sun, Q. Shen, S. Guo. 2017. Role of Silicon on Plant–Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 8 (701): 1-14.

Weir, A, Westerhoff, P, Fabricius, L, Hristovski, K y van Goetz N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 46: 2242-2250.