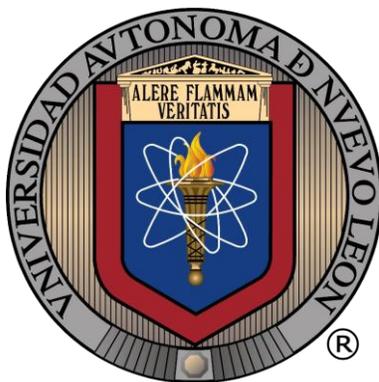


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS INDUCIDAS POR
NANOPARTÍCULAS DE ZnO EN SEMILLAS Y PLANTAS DE CHILE HABANERO
(*Capsicum chinense* Jacq)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
PRESENTA**

M.C. JOSUÉ ISRAEL GARCÍA LÓPEZ

General Escobedo, N.L.

Diciembre, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS INDUCIDAS POR
NANOPARTÍCULAS DE ZnO EN SEMILLAS Y PLANTAS DE CHILE HABANERO
(*Capsicum chinense* Jacq)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
PRESENTA**

M.C. JOSUÉ ISRAEL GARCÍA LÓPEZ

General Escobedo, N.L.

Diciembre, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS INDUCIDAS POR
NANOPARTÍCULAS DE ZnO EN SEMILLAS Y PLANTAS DE CHILE HABANERO
(*Capsicum chinense* Jacq)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
PRESENTA**

M.C. JOSUÉ ISRAEL GARCÍA LÓPEZ

General Escobedo, N.L.

Diciembre, 2019

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROVADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

COMITÉ PARTICULAR



Ph. D. Francisco Zavala García
Director



Ph. D. Ricardo Hugo Lira Saldívar
Codirector



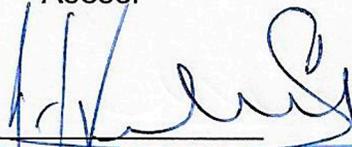
Ph. D. Emilio Olivares Sáenz
Asesor



Ph. D. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado
Asesor



Dr. Guillermo Niño Medina
Asesor



Ph. D. Juan Antonio Vidales Contreras
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

C. Martina López García y C. Isaías García Martínez

A ustedes, que me dieron la vida y que han sido un ejemplo intachable a lo largo de ella. Por su interminable apoyo a lo largo de mi vida, por sus enseñanzas, consejos y por su eterna paciencia he logrado concluir mis estudios de doctorado. Sin ustedes no hubiera sido posible.

A mi compañera de vida, Elena Palacios Valencino y a mi hija Regina García por su apoyo durante esta etapa de mi vida. Sin su apoyo y comprensión, nada hubiera sido posible. Les estaré eternamente agradecido. Las amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios y a Jesús tu hijo querido, por darme la vida y por ser mi fortaleza a lo largo de ella, hoy concluyo una etapa más en mi vida, en la cual se han presentado adversidades y pruebas, sin embargo, nunca me has dejado, tu fidelidad y lealtad siempre me han acompañado. A ti Señor, Gracias.

Dr. Francisco Zavala García

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Francisco Zavala García por preocuparse por nosotros, sus estudiantes, ya que su asesoramiento incondicional y dedicación han contribuido enormemente a mi formación profesional. Fue un privilegio tenerle como profesor, amigo y como director de mi comité de asesoría. Muchas gracias por todo.

Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar

Le agradezco mucho por tomarse el tiempo para educarme. Soy afortunado de haberlo tenido de mi lado como guía académica y también como amigo. Su asistencia y apoyo siempre me ha hecho mirar situaciones complejas desde una perspectiva simple. Muchas gracias por todo.

Dr. Emilio Olivares Sáenz

Le agradezco mucho por explicar términos complicados en palabras simples que se pueden comprender. En la mayoría de las veces me toco observar una larga fila de estudiantes esperando hablar con usted, y sin embargo, cada vez que fue mi turno, me dedico tiempo de calidad academica. Muchas gracias por todo.

Dr. Guillermo Niño Medina

Le estoy muy agradecido por la educación y capacitación que me brindo a lo largo de mis estudios de doctorado. Estoy seguro de que las clases que tomé usted son algunas de las que más han aportado a mi formación profesional, ya que me brindaron las herramientas necesarias para continuar mi desarrollo como investigador. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado

Le agradezco mucho su disposición a ayudarme en mi formación profesional y con mis trabajos de investigación. Sin duda alguna, el trabajo que realiza como docente para educar estudiantes de licenciatura y posgrado es excelente. Muchas gracias por todo.

Al Centro de investigación en Química Aplicada (CIQA), por el apoyo otorgado para la realización de una parte de este proyecto de investigación.

Al Dr. Jorge Gardea Torres Torresdey y al Dr. Keni Cota Ruiz por brindarme la oportunidad de aprender y colaborar en el laboratorio de Química y Biquímica de la Universidad de Texas en el Paso (UTEP).

A la universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Agronomía por darme la oportunidad de estudiar mi doctorado y por permitirme desarrollar este proyecto de investigación en sus instalaciones.

Al CONACYT por brindarme la beca de sustento económico para realizar mis estudios de doctorado (306970).

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	xi
INDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xix
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	5
1.1.1 Hipótesis específicas	6
1.2 Objetivo general.....	6
1.2.1 Objetivos específicos	7
CAPÍTULO 2: EFECTOS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN EL CRECIMIENTO Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE <i>Capsicum chinense</i>	9
2.1 Resumen	9
2.2 Introducción.....	10
2.3 Materiales y métodos	12
2.3.1 Material genético.....	12
2.3.2 Caracterización de nanopartículas.....	13
2.3.3 Tratamientos	13
2.3.4 Germinación de semillas y crecimiento de plántulas.....	14
2.3.5 Actividad enzimática	15
2.3.6 Actividad de POD.....	16
2.3.7 Actividad de APX	16
2.3.8 Actividad de CAT	17
2.3.9 Diseño experimental y análisis estadístico.....	17

2.4 Resultados y discusión.....	18
2.4.1 Caracterización de NPs ZnO.....	18
2.4.2 Efecto de las NPs ZnO sobre la germinación y el vigor de las semillas.....	19
2.4.3 Longitud de plúmula y radícula	23
2.4.4 Actividad enzimática antioxidante	25
2.5 Conclusiones.....	27
2.6 Referencias	28
CAPÍTULO 3: LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC AUMENTAN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>Capsicum annuum</i> L. DURANTE LA GERMINACIÓN	
3.1 Resumen.....	36
3.2 Introducción.....	37
3.3 Materiales y métodos	40
3.3.1 Material vegetal.....	40
3.3.2 Caracterización de las NPs ZnO	40
3.3.3 Tratamientos	41
3.3.4 Germinación de semillas y crecimiento de plántulas.....	41
3.3.5 Extracción de compuestos fenólicos libres	43
3.3.6 Contenido de fenoles totales.....	43
3.3.7 Contenido de flavonoides totales	44
3.3.8 Contenido de taninos condensados	44
3.3.9 Determinación de la capacidad antioxidante de DPPH.....	45
3.3.10 Análisis estadístico.....	45
3.4 Resultados y discusión.....	46
3.4.1 Caracterización de NPs ZnO.....	46
3.4.2 Efecto de las NPs ZnO sobre la germinación y el vigor	47
3.4.3 Efecto de las NPs ZnO en el crecimiento de las plántulas.....	49
3.4.4 Efecto de las NPs ZnO en el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del DPPH	52
3.5 Conclusiones.....	55
3.6 Referencias	56

CAPÍTULO 4: LA APLICACIÓN FOLIAR DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y SULFATO DE ZINC AUMENTA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CHILE HABANERO.....	62
4.1 Resumen.....	62
4.2 introducción.....	63
4.3 Materiales y métodos.....	68
4.3.1 Material vegetal.....	68
4.3.2 Características de las NPs ZnO utilizados en este experimento.....	68
4.3.3 Preparación de las suspensiones.....	69
4.3.4 Exposición foliar a Zn.....	69
4.3.5 Crecimiento de plantas de chile habanero y condiciones de invernadero.....	70
4.3.6 Variables de rendimiento y contenido relativo de clorofila.....	71
4.4 Preparación para el análisis de los frutos de chile habanero.....	72
4.4.1 Evaluaciones fisicoquímicas de los frutos.....	72
4.4.2 Preparación de muestras para capsaicinoides, fenólicos y análisis de capacidad antioxidante.....	74
4.4.3 Extracción de capsaicinoides.....	74
4.4.4 Cuantificación de capsaicina y dihidrocapsaicina por HPLC.....	75
4.4.5 Determinación de las unidades de Scoville.....	75
4.5 Extracción de compuestos fenólicos solubles y ligados.....	76
4.5.1 Determinación de fenoles totales.....	77
4.5.2 Determinación de flavonoides totales.....	77
4.5.3 Determinación de taninos condensados.....	78
4.5.4 Capacidad antioxidante.....	78
4.5.5 Diseño experimental y análisis estadístico.....	80
4.6 Resultados y discusión.....	81
4.6.1 Crecimiento de las plantas de chile habanero.....	81
4.6.2 Contenido relativo de clorofila.....	84
4.6.3 Rendimiento del fruto y biomasa vegetal.....	86
4.6.4 Características cromáticas.....	90
4.6.5 Calidad de los frutos de chile habanero.....	94

4.6.6 Contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina	96
4.6.7 Contenido de fenoles y flavonoides totales	100
4.6.8 Capacidad antioxidante.....	104
4.7 Conclusiones.....	106
4.8 Referencias	107
4.9 Consideraciones finales	117
Apéndice I	119
Apéndice II	132
Apéndice III	145

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Efecto de las NPs ZnO en la longitud de plúmula, radícula y la biomasa seca de las plántulas	50
2. Efecto de la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO ₄ en el desarrollo de frutos y acumulación de biomasa.....	87
3. Características cromáticas en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO ₄	92
4. Efecto de la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO ₄ en la calidad de los frutos de chile habanero	95
5. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales (solubles + ligados) en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO ₄	101
6. Actividad antioxidante en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO ₄	105

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Las micrografías de NPs ZnO: imagen típica de TEM (a) y HRTEM (b) Distribución del tamaño de NPs (c). El patrón SAED típico para el área observada en el panel (a,d), 5 1/nm corresponde al vector de red real y el espacio recíproco.....	18
2. Dependencia de la concentración de NPs ZnO y análisis de polinomios ortogonales para V%, G % y biomasa fresca (mg).	19
3. Longitud de plúmula y radícula de plántulas de <i>C. chinense</i> debido al efecto de cinco concentraciones de NPs ZnO.	21
4. Regresión cuadrática lineal para las variables longitud de plúmula y radícula de las plántulas de <i>C. chinense</i>	23
5. Actividad de las enzimas antioxidante en plántulas de <i>C. chinense</i> tratadas con NPs ZnO. (a) actividad de peroxidasa (POD), (b) actividad de ascorbato de peroxidasa (APX), (c) actividad de catalasa (CAT). T1 = 0 mg L^{-1} , T2 = 100 mg L^{-1} ; T3 = 200 mg L^{-1} ; T4 = 300 mg L^{-1} ; T5 = 400 mg L^{-1} ; T6 = 500 mg L^{-1} . Los valores son promedios de cuatro repeticiones (n = 4), las barras representan el error estándar de la media, diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).....	26
6. Las micrografías muestran una muestra de nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO). (a) Imagen típica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una nanopartícula, (b) Micrografía típica de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de una nanopartícula, (c) Distribución de tamaños de NPs (d) Difracción de área típica seleccionada (SAED), patrón obtenido para el área observada en el panel (a).	47
7. Porcentajes de vigor (A) y germinación (B) en semillas de <i>C. annuum</i> tratadas con NPs ZnO a diferentes concentraciones (0, 100, 200 y 500 ppm). Las barras representan la media (n = 4) \pm desviación estándar.	

Las diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) y representan las diferencias entre tratamientos.	48
8. Efecto de las NPs ZnO en el crecimiento de plántulas de <i>C. annuum</i> . Cada plántula es representativa de una unidad experimental.	50
9. Contenido fenólico en plántulas de <i>C. annuum</i> tratadas con NPs ZnO. (A) Fenoles totales, (B) Flavonoides, (C) Taninos condensados y (D) Capacidad antioxidante (DPPH) (milimoles equivalentes de Trolox por kilogramo de muestra (mmol ET kg^{-1})). Los valores son el promedio de cuatro repeticiones. Medias ($n = 4$), las barras representan la desviación estándar de la media. Las diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) y representan las diferencias entre los tratamientos.	52
10. Representación esquemática de cada una de las etapas vegetativas del cultivo, además, se presenta una imagen representativa de la forma en que se aplicaron los tratamientos.	70
11. Efecto de la aplicación foliar de ZnSO_4 y NPs ZnO en parámetros agronómicos (altura de planta y diámetro de tallo), y bioquímicos (clorofila SPAD) en diferentes estados fenológicos de las plantas de <i>C. chinense</i> . (CV) crecimiento vegetativo, (FL) floración, (DF) desarrollo del fruto y (M) madurez. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias ($n = 5$), las barras representan la desviación estándar de la media; letras diferentes significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) y representan las diferencias entre tratamientos, en cada etapa fenológica.	82
12. Contenido de capsaicinoides en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO_4 . (a) capsaicina, dihidrocapsaicina y capsaicinoides totales, (b) Unidades de Picor Scoville (SHU^2). Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias ($n=3$), las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).	97
13. Cromatogramas para capsaicina y dihidrocapsaicina, en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO_4 : (a) estándares; (b) control; (c) $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4$; (d) 1000 mg L^{-1} NPs ZnO; (e) $2000 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4$; (f) 2000 mg L^{-1} NPs ZnO.	100

RESUMEN

En la actualidad, el uso de nanopartículas de ingeniería (NPs) en las prácticas agrícolas como nanofertilizantes y nanoplaguicidas ha llamado la atención de los investigadores, ya que representan un avance en la aplicación de fertilizantes y son una de las opciones más efectivas para una mejora considerable del rendimiento agrícola. Las NPs derivadas de hierro, cobre, cerio, plata, zinc y titanio se utilizan como fuentes importantes para la preparación de fertilizantes y pesticidas. Entre las nanopartículas, las de óxido de zinc (NPs ZnO), se consideran bioseguras para la aplicación a especies biológicas, además, son la cuarta materia prima más grande en la industria de la nanotecnología. A nivel mundial, se estima que en todos los sectores de la economía se utilizan alrededor de 34,000 toneladas de NPs ZnO por año.

En la agricultura, la aplicación de NPs ZnO puede generar efectos beneficiosos y también perjudiciales en las plantas y, su influencia depende de la composición, concentración, tamaño y propiedades químicas de las NPs, así como de la especie de planta. El efecto beneficioso de las NPs ZnO se atribuye a la liberación gradual de los iones de Zn^{++} por un periodo de tiempo prolongado. Por otra parte, a concentraciones elevadas se ha demostrado que pueden afectar el

crecimiento de las plantas y generar estrés oxidativo a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que da como resultado cambios en la actividad del sistema enzimático antioxidante y metabolitos secundarios, compuestos responsables de la neutralización de los radicales libres tóxicos. Sin embargo, a la fecha no existe ningún estudio reportado en la literatura que enfoque sus esfuerzos a estudiar el efecto de las NPs ZnO sobre la germinación, el crecimiento de las plantas y la actividad del sistema enzimático antioxidante y no enzimático (compuestos fenólicos) en el cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense*).

Debido a lo anterior y específicamente en este cultivo, se carece de información relacionada con el impacto de las NPs ZnO en el desarrollo de las plantas, rendimiento y la acumulación de compuestos bioactivos en los frutos de chile habanero. El chile habanero (*C. chinense*), es un cultivo ampliamente distribuido en América Latina, con una demanda creciente en los mercados mexicanos e internacionales. La importancia económica de este cultivo se basa principalmente en la utilización de sus frutos, ya que son una fuente importante de componentes nutricionales que poseen una alta cantidad de vitaminas (A, C y E), pero sobre todo por sus propiedades antioxidantes y quelantes al tener una alta acumulación de fenilpropanoides (compuestos fenólicos) y alcaloides (capsaicinoides) que pueden ayudar a mantener una buena salud.

Por lo tanto, para mejorar nuestro conocimiento sobre el impacto de la aplicación de NPs ZnO en este cultivo (*C. chinense*), el proyecto de investigación se

llevó a cabo en tres etapas. La primer etapa, tuvo como objetivo evaluar los efectos de las NPs ZnO en semillas de *C. chinense* a concentraciones entre 100 y 500 mg L⁻¹ en la germinación y el vigor de las semillas, además de cuantificar la actividad de enzimas antioxidantes como catalasas (CAT), peroxidasas (POD) y ascorbato peroxidasas (APX). La segunda etapa, tuvo como objetivo estudiar el impacto de las NPs ZnO en concentraciones de 0, 100, 200 y 500 ppm en el crecimiento de las plántulas, la acumulación de biomasa y la biosíntesis de compuestos fenólicos (fenoles totales, flavonoides y taninos condensados) y la capacidad antioxidante expresada en DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

En la tercera etapa, se realizó un estudio en invernadero que tuvo como objetivo comparar las respuestas agronómicas de las plantas de *C. chinense* a las aplicaciones foliares de NPs ZnO y ZnSO₄ a concentraciones de 1000 y 2000 mg L⁻¹. Las plantas se cultivaron hasta la madurez y durante el desarrollo del cultivo se evaluaron parámetros agronómicos como el crecimiento de la planta, diámetro de tallo y el contenido relativo de clorofila. En la cosecha, se evaluó la acumulación de biomasa, el rendimiento y la cantidad de compuestos bioactivos de los frutos de chile habanero, específicamente orientado a la cuantificación por espectrofotometría de compuestos fenólicos (polifenoles totales, flavonoides y taninos condensados) y la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP). Además, con el uso de cromatografía líquida HPLC-DAD se cuantificó la acumulación de alcaloides (capsaicina y dihidrocapsaicina).

Los resultados de la primera etapa, indicaron que a medida que los niveles de NPs ZnO aumentaron en un rango de 100-400 mg L⁻¹, la germinación y la biomasa fresca se vieron afectadas positivamente. La biomasa máxima se alcanzó a 400 mg L⁻¹, ya que excedió al control (0 mg L⁻¹) en un 114%. Por otra parte, los resultados del análisis de las actividades enzimáticas antioxidantes mostraron que la actividad de POD y CAT se incrementó en todas las concentraciones de 100 a 500 mg L⁻¹ con NPs ZnO, mientras que la actividad de ascorbato peroxidasa (APX) se redujó a una concentración de 500 mg L⁻¹.

En la segunda etapa, los parámetros morfológicos evaluados, revelaron que los tratamientos con NPs ZnO no afectaron significativamente el desarrollo de la plúmula, pero tenían un impacto significativo ($p \leq 0.01$) en la longitud de la radícula. Las suspensiones a 100, 200 y 500 ppm de NPs ZnO inhibieron el crecimiento de la radícula de las plántulas y promovieron la acumulación de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante expresada como DPPH, como resultado de un efecto fitotóxico en este tejido de la plántula.

En la tercera etapa, la aplicación de NPs ZnO a 1000 mg L⁻¹ afectó positivamente la altura de la planta, el diámetro del tallo, el contenido de clorofila, el rendimiento del fruto y la acumulación de biomasa en comparación con los tratamientos control y ZnSO₄. Por el contrario, la aplicación de NPs ZnO a 2000 mg L⁻¹ afectó negativamente el crecimiento de las plantas pero aumentó significativamente el contenido de capsaicina en un 19.3%, la dihidrocapsaicina en

un 10.9% y las Unidades Scoville en un 16.4%. Además, a 2000 NPs ZnO mg L⁻¹ también aumentó el contenido de fenoles totales y flavonoides totales (solubles + ligados) en los frutos (14.50% y 26.9%, respectivamente), lo que resultó en una mayor capacidad antioxidante en ABTS (2,2'azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y FRAP (poder antioxidante reductor férrico) (15.4%, 31.8% y 20.5%, respectivamente).

SUMMARY

Currently, the use of engineering nanoparticles (NPs) in agricultural practices such as nanofertilizers and nanoplaguicides has attracted the attention of researchers, since they represent an advance in fertilizer application and are one of the most effective options for improvement of agricultural yield. NPs derived from iron, copper, cerium, silver, zinc and titanium are used as important sources for the preparation of fertilizers and pesticides. Among these types of NPs, zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are considered a biosafe material for application to biological species, and are the fourth largest raw material in the nanotechnology industry. Worldwide, it is estimated that around 34,000 tons of ZnO NPs are used per year in all sectors of the economy.

In agriculture, the application of ZnO NPs can generate beneficial and also harmful effects on plants and, their influence depends on the composition, concentration, size and chemical properties of NPs, as well as the plant species. The beneficial effect of ZnO NPs is attributed to the gradual release of Zn^{++} ions for a prolonged period of time. On the other hand, at high concentrations it has been shown that they can affect plant growth and generate oxidative stress through the generation of reactive oxygen species (ROS), which results in changes in the activity

of the antioxidant enzyme system and metabolites secondary, compounds responsible for the neutralization of toxic free radicals.

However, to date there is no study reported in the literature that focuses its efforts to study the effect of ZnO NPs on germination, plant growth and the activity of the antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidant system (phenolic compounds) in the crop of habanero pepper (*Capsicum chinense*). Due to the above and specifically in this crop, there is a lack of information related to the impact of ZnO NPs on plant development, yield and the accumulation of bioactive compounds in the fruits of habanero pepper.

Habanero pepper (*C. chinense*), is a widely distributed crop in Latin America, with a growing demand in mexican and international markets. The economic importance of this crop is mainly based on the use of its fruits, since they are an important source of nutritional components that have a large amount of vitamins (A, C and E), but above all for their antioxidant and chelating properties with a high accumulation of phenylpropanoids (phenolic compounds) and alkaloids (capsaicinoids) that can help maintain good health.

Therefore, to improve our knowledge about the impact of the application of ZnO NPs in this crop (*C. chinense*), the research project was carried out in three stages. The first stage aimed to evaluate the effects of ZnO NPs in *C. chinense* seeds at concentrations between 100 and 500 mg L⁻¹ in the germination and vigor of the

seeds, in addition to quantifying the activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), peroxidases (POD) and ascorbate peroxidases (APX). The second stage, was aimed at studying the impact of ZnO NPs at concentrations of 0, 100, 200 and 500 ppm in seedling growth, biomass accumulation and biosynthesis of phenolic compounds (total phenols, flavonoids and condensed tannins) and the antioxidant capacity expressed in DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

In the third stage, a greenhouse study was conducted that aimed to compare the agronomic responses of *C.chinense* plants to the foliar applications of ZnO NPs and ZnSO₄ at concentrations of 1000 and 2000 mg L⁻¹. Plants were grown until maturity and during the development of the crop, agronomic parameters such as plant growth, stem diameter and relative chlorophyll content were evaluated. In the harvest, the biomass accumulation, yield and quantity of bioactive compounds of the fruits of habanero pepper obtained were evaluated, specifically oriented to the quantification by spectrophotometry of phenolic compounds (total polyphenols, flavonoids and condensed tannins) and antioxidant capacity (DPPH, ABTS and FRAP). In addition, with the use of HPLC-DAD liquid chromatography, the accumulation of alkaloids (capsaicin and dihydrocapsaicin) were quantified.

Results of the first stage indicated that as the levels of ZnO NPs increased in a range of 100-400 mg L⁻¹, germination and fresh biomass were positively affected. The maximum biomass was reached at 400 mg L⁻¹, since it exceeded control (0 mg L⁻¹) by 114%; at a concentration of 500 mg L⁻¹, a small reduction was found in 9% compared

to 400 mg L⁻¹. On the other hand, the results of the analysis of the antioxidant enzymatic activities showed that the activity of POD and CAT was increased in all concentrations from 100 to 500 mg L⁻¹ with ZnO NPs, while the ascorbate peroxidase activity was reduced to a concentration of 500 mg L⁻¹.

In the second stage, the morphological parameters evaluated revealed that treatments with ZnO NPs did not significantly affect the development of the plumule but had a significant impact ($p \leq 0.01$) on the length of the radicle. The suspensions at 100, 200 and 500 ppm of ZnO NPs inhibited the growth of the seedling radicle and promoted the accumulation of phenolic compounds and the antioxidant capacity expressed as DPPH, as a result of a phytotoxic effect on this tissue.

In the third stage, the application of ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹ positively affected plant height, stem diameter, chlorophyll content, fruit yield and biomass accumulation compared to control treatments and ZnSO₄. On the contrary, the application of ZnO NPs at 2000 mg L⁻¹ negatively affected plant growth, but significantly increased the capsaicin content by 19.3%, dihydrocapsaicin by 10.9% and Scoville units by 16.4%. In addition, at 2000 mg L⁻¹ with ZnO NPs also increased the content of total phenols and total flavonoids (soluble + bound) in fruits (14.50% and 26.9%, respectively), which resulted in a higher antioxidant capacity in ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) (15.4%, 31.8% and 20.5%, respectively).

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es considerada un campo de investigación en crecimiento. En las últimas décadas, se ha presentado una expansión considerablemente rápida en el uso de nanopartículas de ingeniería (NPs) con una amplia gama de aplicaciones (Marslin *et al.*, 2017). Además, en la última década el impacto de las NPs en los organismos vivos, especialmente en las plantas terrestres ha llamado mucho la atención (Rossi *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2018), debido a que los agroquímicos que contienen NPs, proporcionan medios eficientes para distribuir pesticidas y fertilizantes en forma controlada, considerando esto como un procedimiento con alta especificidad del sitio para reducir el daño colateral (Khan *et al.*, 2017).

Las NPs utilizadas en la agricultura tienen como objetivo mejorar la eficiencia y sostenibilidad de las prácticas agrícolas utilizando menos insumos y, por lo tanto, generar menos desperdicio que las prácticas convencionales; sin embargo, el uso de nano-agroquímicos no está exento de riesgos y este tema está recibiendo mayor atención (Coll *et al.*, 2016; Pullagurala *et al.*, 2018). Los estudios que abordan los efectos de las NPs basadas en TiO₂, CuO, Ag y ZnO en plantas comestibles, muestran resultados diferentes y en ocasiones contrastantes (Raliya *et al.*, 2015;

Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017; Cota-Ruiz *et al.*, 2018; Akanbi-Gada *et al.*, 2019; Rossi *et al.*, 2019).

Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) son de particular interés, no solo por su extenso uso en diversos productos de consumo incluyendo cosméticos, recubrimientos, aplicaciones energéticas y medio ambientales (Pullagurala *et al.*, 2018), sino también, por qué están siendo cada vez más incorporadas en productos agrícolas (Singh *et al.*, 2018). Por ejemplo, las NPs ZnO han sido investigadas como ingrediente activo para insecticidas (Salem *et al.*, 2015), por sus antimicóticos y propiedades antibacterianas (Dimkpa *et al.*, 2013), y como fertilizantes promotores del crecimiento en plantas (Rossi *et al.*, 2019), ya que el zinc (Zn) juega un papel importante en las funciones de la planta, modifica los efectos de las auxinas a través de la regulación de la síntesis de triptófano y actúa como cofactor en las enzimas redox como la superóxido dismutasa y las deshidrogenasas (Narendhran *et al.*, 2016).

En este sentido, varios estudios han demostrado el potencial de las NPs ZnO para mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas. Por ejemplo, un estudio realizado por Awasthi *et al.* (2017), informaron que la aplicación de NPs ZnO a 50 mg L⁻¹ mejoró la germinación de semillas y la biomasa vegetal en plantas de trigo (*Triticum aestivum*). Por su parte, Rossi *et al.* (2019) indicaron que la aplicación foliar de NPs ZnO influyó positivamente en el crecimiento y la fisiología de plantas de café (*Coffea arabica* L.), con efectos más favorables que las sales convencionales de Zn

(ZnSO₄), principalmente debido a su mayor capacidad para penetrar en la hoja. Otra investigación realizada en arboles de granada (*Punica granatum* cv. Ardestani) demostró que la fertilización foliar, con cantidades relativamente bajas de nanofertilizantes de Zn y B, incrementó el rendimiento y la calidad de los frutos, incluyendo aumentos en los azúcares del jugo e incrementos en el índice de madurez (Davarpanah *et al.*, 2016).

Por el contrario, López-Moreno *et al.* (2017) mostraron que en semillas de maíz, la aplicación de NPs ZnO a 400 mg kg⁻¹ afectó la germinación y el crecimiento de la raíz y la plúmula en 40 y 47 %, respectivamente. Lo anterior se debe, a que el exceso de Zn en los tejidos vegetales tiene impactos tóxicos directos, resultando en clorosis o la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que generan estrés oxidativo (Akanbi-Gada *et al.*, 2019), y pueden llegar a afectar el rendimiento y el valor nutricional de las plantas (Asati *et al.*, 2016; García-Gómez *et al.*, 2018). Estudiar los efectos de las NPs en las plantas es importante dado que el destino y el comportamiento de los nanomateriales en el medio ambiente aún carecen de comprensión.

La generación de ERO inducida por la aplicación de NPs a plantas, juega un papel crítico en el mecanismo de fitotoxicidad, debido a su alta reactividad y propiedades oxidantes de las especies reactivas como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), radicales hidroxilo (OH⁻) y súper oxido (O₂) (Yang *et al.*, 2017). En este caso, las plantas que están sometidas a estrés oxidativo causado por una gran

acumulación de ERO, activan los sistemas de defensa antioxidantes, entre los principales se encuentran los antioxidantes no enzimáticos (Singh *et al.*, 2015), incluidos los compuestos fenólicos, flavonoides y componentes enzimáticos como catalasas (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión peroxidasa (POD) (Yang *et al.*, 2017).

Los fenilpropanoides desempeñan un papel destacado en los mecanismos de desintoxicación de ERO (Mahendra *et al.*, 2008), como donadores de electrones en las estructuras de orgánulos y pueden eliminar directamente las especies moleculares de oxígeno activo, principalmente debido a sus propiedades redox (Bhumi *et al.*, 2014). Por su parte, el incremento en la actividad de enzimas antioxidantes tiene como objetivo convertir el H_2O_2 en agua y oxígeno, proporcionando protección contra el daño oxidativo (García-López *et al.*, 2018). Varios estudios han informado sobre el potencial de toxicidad de las NPs ZnO en cultivos como la cebolla (Laware y Raskar, 2014), el guisante verde (Mukherjee *et al.*, 2016) y la espinaca (Singh *et al.*, 2017).

El chile habanero (*C. chinense*) es un cultivo con una demanda creciente en los mercados mexicanos e internacionales y su importancia económica se basa principalmente en la utilización de sus frutos, ya que son una fuente importante de componentes nutricionales que poseen una alta cantidad de vitaminas (A, C y E), pero sobre todo por sus propiedades antioxidantes y quelantes al tener una alta acumulación de fenilpropanoides (compuestos fenólicos) y capsaicinoides (Castro-

Concha *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de que *C. chinense* es un cultivo de gran importancia económica, ningún estudio ha abordado específicamente los efectos de las NPs ZnO (tamaño de partículas <100 nm), sobre la fisiología de semillas, el crecimiento de las plantas, frutos y las modulaciones bioquímicas en las cuales están involucrados los sistemas enzimáticos antioxidantes (CAT, POD, APX) y la biosíntesis de diferentes tipos de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides y taninos condensados).

En resumen, la información en la literatura sobre los efectos de las NPs ZnO en este cultivo es inexistente, por lo tanto, este trabajo de investigación tiene como objetivo definir las respuestas agronómicas y bioquímicas inducidas por NPs ZnO en semillas, plantas y frutos de *C. Chinense*.

1.1 Hipótesis general

La aplicación de suspensiones con NPs ZnO a semillas y plantas de *C. chinense* tiene efectos en la germinación, desarrollo de plántulas, crecimiento de plantas y estimula la actividad enzimática antioxidante (CAT, POD y APX) y el nivel de antioxidantes no enzimáticos (fenoles, flavonoides y taninos condensados) de los tejidos de plantas y frutos.

1.1.1 Hipótesis específicas

- La aplicación de suspensiones con NPs ZnO a las semillas de *C. chinense*, afecta el vigor, crecimiento de las plántulas y la actividad de enzimas antioxidantes como CAT, APX y POD (Capítulo 2).
- Las NPs ZnO alteran la biosíntesis de compuestos fenólicos (fenoles totales, flavonoides y taninos condensados) y la capacidad de antioxidantes del radical DPPH de los brotes de *C. chinense*, e inhiben el desarrollo de las plántulas (Capítulo 3).
- La aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄ afectan el crecimiento y rendimiento de la planta de *C. chinense*, además de la acumulación de compuestos bioactivos (capsaicinoides y fenoles) en los frutos obtenidos de la plantas sometidas a compuestos basados en Zn (Capítulo 4).

1.2 Objetivo general

Evaluar el impacto de la aplicación de suspensiones con NPs ZnO en diferentes etapas del desarrollo fenológico de *C. chinense* (semilla, desarrollo de plántulas y crecimiento de plantas), y determinar la actividad del sistema enzimático antioxidante (CAT, POD y APX) y, la concentración de metabolitos secundarios no enzimáticos (fenoles, flavonoides y taninos condensados) en plantas y frutos.

1.2.1 Objetivos específicos

- Determinar los efectos de las NPs ZnO en la germinación de semillas, el crecimiento de las plántulas y la actividad de enzimas antioxidantes de *Capsicum chinense* (Capítulo 2).
- Evaluar los efectos de las NPs ZnO en la germinación de semillas, el crecimiento de las plántulas, la biosíntesis de compuestos fenólicos (fenoles totales, flavonoides y taninos condensados), y la capacidad antioxidante del DPPH de los extractos de plántulas expuestas a NPs ZnO (Capítulo 3).
- Comparar las respuestas de crecimiento de las plantas de chile habanero a las aplicaciones foliares de ZnSO₄ y NPs ZnO, y analizar la calidad y la acumulación de compuestos bioactivos en los frutos obtenidos de plantas sometidas a compuestos basados en Zn (Capítulo 4).

Por lo tanto, para cumplir con el objetivo general de esta investigación evaluamos el impacto de la aplicación de suspensiones con NPs ZnO en diferentes etapas del desarrollo fenológico de *C. chinense* (semilla, desarrollo de plántulas y crecimiento de plantas). En la primera etapa, determinamos los efectos de las NPs ZnO en el crecimiento de plántulas de *C. chinense* y la actividad de enzimas antioxidantes (capítulo 2). En la segunda etapa, se evaluó el impacto de las NPs ZnO en el

contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de *Capsicum annum* durante la germinación (capítulo 3). En la última etapa, se determinó el efecto de la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄ en el crecimiento y rendimiento de las plantas de *C. chinense*, además de cuantificar la acumulación de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de los frutos (capítulo 4). Por lo que, consideramos que los resultados de esta investigación contribuyen a la información científica relacionada con las interacciones del sistema NPs ZnO-planta, y puede emplearse como un patrón de referencia para la producción de chile habanero.

CAPÍTULO 2: EFECTOS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN EL CRECIMIENTO Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE *Capsicum chinense*

Josué Israel García-López^a, Ricardo Hugo Lira-Saldivar^b, Francisco Zavala-García^a, Emilio Olivares-Sáenz^a, Guillermo Niño-Medina^a, Norma Angélica Ruiz-Torres^c, Bulmaro Méndez-Argüello^b & Enrique Díaz-Barriga^b (2018): Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*, Toxicological & Environmental Chemistry, DOI: 10.1080/02772248.2018.1550781

Fecha de publicación: 22 de Noviembre 2018 (Apéndice 1)

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Química y Bioquímica, Francisco Villa S/N, Col. Ex-Hacienda el Canadá, C.P. 66050 General Escobedo, Nuevo León, Mexico.

^bCentro de investigación en Química Aplicada, Departamento de Agroplasticultura, Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coahuila.

^cCentro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de, Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro. No.1923, Buenavista, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila.

*Autor de correspondencia: hugo.lira@ciqa.edu.mx

2.1 Resumen

Los efectos de las suspensiones de nanopartículas de óxido de zinc a concentraciones entre 100 y 500 mg L⁻¹ sobre la germinación de semillas de *Capsicum chinense* y el vigor de las plántulas se evaluaron mediante un diseño completo aleatorizado con cuatro repeticiones, lo que resultó en un aumento de la germinación y un mejor desarrollo de las longitudes de plúmula y radícula. Las actividades de peroxidasas, catalasas y ascorbato peroxidasas fueron determinadas, lo que demostró que a todas las concentraciones las actividades de las dos primeras

enzimas aumentaron, mientras que la actividad de la última enzima se redujo a 500 mg L⁻¹. Los pretratamientos de semillas con nanopartículas de ZnO pueden mejorar la germinación y el desarrollo de las plántulas y las actividades de las enzimas antioxidantes.

2.2 Introducción

Los nanomateriales tienen un gran potencial para modificar las prácticas agrícolas convencionales. Las nanopartículas derivadas de hierro, cobre, plata y zinc se utilizan como fertilizantes (Liu y Lal, 2015) o pesticidas (Grillo *et al.*, 2016). Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) demostraron influir en la anatomía, bioquímica y fisiología de las plantas (Zafar *et al.*, 2016). Además, algunos autores mencionan que las NPs ZnO son agentes antimicrobianos que controlan la infección y la propagación de hongos fitopatógenos como *Penicillium expansum*, *Bortrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium culmorum* (Devipriya y Roopan, 2017; Hao *et al.*, 2017).

También, se ha demostrado que las NPs ZnO aumentan las tasas de germinación de semillas (Rawat *et al.*, 2018) y promueven el crecimiento de plúmulas y radículas, así como la acumulación de biomasa de las plantas (Janmohammadi y Sabaghnia 2015; Razzaq *et al.* 2015). Probablemente, debido a su naturaleza como micronutriente esencial, el zinc juega un papel importante en el funcionamiento de la planta, como en la regulación de las auxinas por medio de la síntesis de triptófano y al ser un

cofactor en las enzimas redox como superóxido dismutasa y deshidrogenasas (Narendhran *et al.*, 2016).

Venkatachalam *et al.* (2017), también demostraron la mejora del crecimiento con la aplicación de NPs ZnO en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.). De manera similar, Elizabeth *et al.* (2017) verificaron que las NPs ZnO estimularon algunos atributos de rendimiento como el número de flores y frutos; sin embargo, otros metales como las nanopartículas de óxido de cobre a 1000 mg L^{-1} indujeron una inhibición significativa en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Vigna radiata* (Singh *et al.*, 2017). Las nanopartículas metálicas adicionales como el óxido férrico (Fe_2O_3) y el óxido de titanio (TiO_2) también inhibieron la germinación de las semillas de *Oryza sativa* (Hao *et al.*, 2016). Asimismo, Priester *et al.* (2012) detectaron disminución en el crecimiento y rendimiento de las plantas de *Glycine max* expuestas a NPs CeO_2 .

Como resultado, los hallazgos de diferentes investigadores sugieren efectos positivos y negativos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas por parte de las NPs, y parece que su influencia en las plantas depende de la composición, concentración, tamaño, propiedades físicas y químicas de las NPs, así como de la especie (Siddiqui *et al.* 2015). Los efectos positivos de las NPs en las plantas son el resultado de que los materiales aplicados a nanoescala modifican sus características físicas, químicas y biológicas, así como sus propiedades catalíticas, que a su vez impactan en la fisiología y bioquímica de las plantas.

Las NPs mejoran la capacidad de las plantas para absorber y utilizar agua y fertilizantes, junto con la estimulación de los sistemas antioxidantes (Qados, 2015). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar los efectos de las NPs ZnO en la germinación de semillas, el crecimiento de las plántulas y las enzimas antioxidantes de *Capsicum chinense*, ya que el chile habanero es un cultivo importante con una demanda creciente en los mercados mexicanos e internacionales y por qué, a pesar de su creciente importancia, no se ha realizado ninguna investigación sobre las respuestas de *C. chinense* a las NPs ZnO.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Material genético

La variedad de *C. chinense* utilizada fue Chichen Itza (Seminis, St. Louis, MO, USA), es una planta vigorosa y de maduración temprana que puede cultivarse hasta dos semanas antes que otras variedades. Los frutos tienen tres lóculos y un atractivo color naranja, que se caracterizan por su alto grado de pugnecencia con 10,500 unidades de picor Scoville cuando están fresco y hasta 200,000 cuando están en seco.

2.3.2 Caracterización de nanopartículas

Las NPs ZnO utilizadas en este trabajo se adquirieron de Materiales Nanoestructurados y Amorfos Inc. (Houston, TX, USA). La morfología y microestructura de las muestras se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión convencional y de alta resolución (TEM y HRTEM) y difracción de electrones de área seleccionada (SAED) usando un microscopio (FEI-TITAN 80–300kV, Fisher Scientific, Hillsboro, OR, USA), operado a una tensión de aceleración de 300 kV. Las micrografías TEM y HRTEM se procesaron por medio del software de transformación rápida de Fourier (Digital Micrograph 3.7.0, Gatan Software, Pleasanton, CA, USA).

2.3.3 Tratamientos

Las NPs ZnO se prepararon en suspensiones con un tamaño de 18 ± 8 nm. La concentración inicial fue de 2000 mg L^{-1} , preparada en agua desionizada estéril y dispersada con un sonicador de sonda (Q500-110, Qsonica, Newtown, CT, USA), durante 25 min. La suspensión se diluyó y se usaron muestras de 100, 200, 300, 400 y 500 mg L^{-1} . El tiempo de dispersión y las concentraciones se estandarizaron mediante un experimento preliminar.

2.3.4 Germinación de semillas y crecimiento de plántulas

Las semillas se contaron en lotes de 100 por tratamiento, se usaron pinzas de disección para colocar las semillas en recipientes de tereftalato de polietileno de 15 cm y 20 cm sobre dos capas de papel de filtro (Whatman, diámetro 90 mm). Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: 100 mg L⁻¹ (T2), 200 mg L⁻¹ (T3), 300 mg L⁻¹ (T4), 400 mg L⁻¹ (T5) y 500 mg L⁻¹ (T6) de suspensiones con NPs ZnO. Las semillas de control (T1) se trataron con agua destilada. Los tratamientos se aplicaron una vez durante la etapa de imbibición con una pipeta (PIPETMAN Classic 1–10mL, Gilson, Middleton, WI, EE. UU.). Se agregaron diez mililitros de suspensión de NPs ZnO a las concentraciones mencionadas anteriormente para cada tratamiento. Las semillas se colocaron durante 72 h en una cámara de prueba (Equitek EGCS 3S, 301 3SHR, Equitek, Guadalajara, Mexico) a 25 °C ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Una vez que se completó el período de imbibición de la semilla, se plantaron cuatro réplicas de 25 semillas por tratamiento en papel Anchor (Seedburo Equipment Company, Hidalgo, TX, USA). El papel de Anchor se humedeció con agua destilada, luego se colocaron 25 semillas horizontalmente sobre el papel, cuidando que el embrión de semillas se ubicara hacia abajo; luego se humedeció otro papel del mismo tamaño para cubrir las semillas. Posteriormente, se plegaron en un rollo de 4 cm de ancho, se colocaron en cestas de tereftalato de polietileno de 20 cm de ancho y 45 cm de alto, y se volvieron a colocar en la cámara de prueba durante 14 días. El

bioensayo se desarrolló de acuerdo con las normas ISTA (2004). El vigor (V%) se determinó como porcentaje de plántulas normales del número total de plántulas, y la tasa de germinación (G%), como porcentaje de semillas germinadas del número total de semillas, registrado 7 y 14 días después de la siembra; La biomasa fresca por plántula se determinó después de los 14 días (Corral-Díaz *et al.*, 2014).

Las plántulas normales fueron aquellas que tenían raíz y plúmula, cada una de ellas con un desarrollo total de 2.0 cm. La longitud de la plúmula se midió desde la intersección raíz-hipocotilo hasta la base del cotiledón, mientras que la longitud de la radícula se midió desde la base del hipocotilo hasta el ápice de la radícula. La biomasa fresca de las plántulas normales se determinó al final del bioensayo con una balanza analítica.

2.3.5 Actividad enzimática

Al final del bioensayo, las plántulas fueron colocadas en bolsas de polietilo y congeladas con nitrógeno líquido. Las muestras fueron procesadas para determinar la actividad de peroxidasas (POD), ascorbato peroxidasas (APX) y catalasas (CAT). Por lo tanto, se utilizaron 200 mg de tejido (plúmula y radícula) para obtener el extracto proteico según Elavarthi y Martin (2010). En un mortero precongelado, el tejido se macero con nitrógeno líquido añadiendo polivinilpirrolidona al 0.1%, las muestras se recogieron en microtubos de centrifugación y 1 mL de tampón de extracción (tampón de fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 7, suplementado con EDTA 0.1 mmol

L⁻¹) se agregó a cada muestra. Las mezclas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4 °C. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

2.3.6 Actividad de POD

La actividad de POD se determinó de acuerdo con Kwak *et al.* (1995) usando pirogalol como sustrato. El volumen de reacción fue de 3 mL que contenía 15 µL del extracto de proteína, 2.5 mL de tampón fosfato (pH 8, 100 mmol L⁻¹), 320 µL de pirogalol al 5% y se hizo reaccionar con 165 µL de H₂O₂ a 0.147 mmol L⁻¹ (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). La reacción se inició mediante la adición de H₂O₂, y el aumento de la absorbancia se midió a 420 nm cada 20 segundos durante 1 min. Una unidad de actividad de POD se define como 1.0 mg de purpurogallina formada en 20 s a pH 6 a $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.7 Actividad de APX

La actividad APX se determinó como se describe por Nakano y Asada (1981); después de la disminución de la absorbancia a 290 nm debido a la oxidación del ascorbato. La mezcla de reacción consistió en 15 µL de extracto de proteína, 885 µL de tampón fosfato (pH 7, 50 mmol L⁻¹), 50 µL de ácido ascórbico a 10 mmol L⁻¹ y reaccionó con 50 µL a 10 mmol L⁻¹ de H₂O₂. La actividad APX se expresó como la cantidad de proteína que produce 1 mmol de ascorbato oxidado por minuto ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3.8 Actividad de CAT

La descomposición de H_2O_2 se midió por la disminución de la absorbancia a 240 nm según Elavarthi y Martin (2010). La mezcla de reacción consistió en 15 μL de extracto de proteína, 965 μL de tampón fosfato (pH 7, 50 mmol L^{-1}) y reaccionó con 20 μL de 0.5 mmol L^{-1} de H_2O_2 en un volumen de reacción de 1 mL ($\epsilon = 0.04 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

2.3.9 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones; el modelo lineal general fue $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$, donde la variable de respuesta es Y_{ij} , μ el promedio general, α_i el efecto de las concentraciones de NPs ZnO y e_{ij} el error experimental. La unidad experimental consistió en un rollo de papel Anchor que contenía 25 semillas de chile habanero.

Las evaluaciones de los datos se determinaron mediante análisis de varianza y la comparación promedio de los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (SPSS Statistics, 21 Version). Para evaluar las posibles tendencias lineales (L) cuadráticas (Q) o cúbicas (C) de cada variable y tratamiento, se realizó un análisis polinomial ortogonal. En el análisis de polinomios ortogonales, las tendencias L, Q y C se consideraron significativas a un nivel de $p \leq 0.05$.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Caracterización de NPs ZnO

En la imagen TEM de la muestra de ZnO NPs (Figura 1 (a)), se puede identificar la morfología cuasi esférica de las NPs que aparecen dispersas en la rejilla del microscopio. En la Figura 1 (b), se muestra una imagen TEM representativa de una NP; se pueden observar franjas de celosía con una separación de 2.81 Å, correspondiente a los planos de celosía {100} de la estructura hexagonal de ZnO. La Figura 1 (c) muestra la distribución de tamaños de las NP obtenidas midiendo más de 300 partículas.

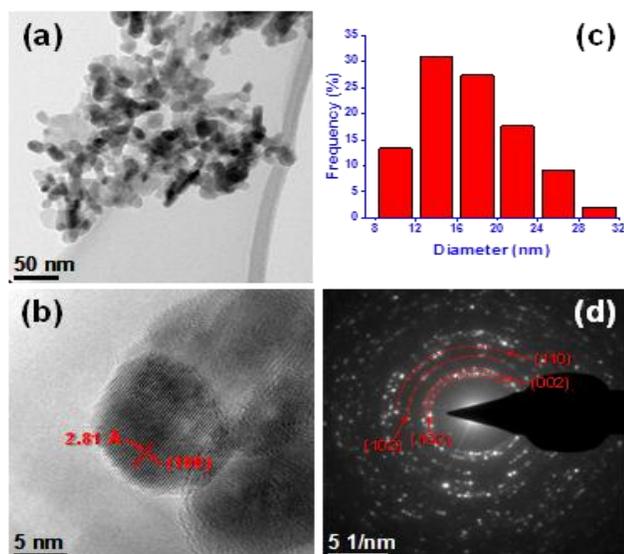


Figura 1. Las micrografías de NPs ZnO: imagen típica de TEM (a) y HRTEM (b) Distribución del tamaño de NPs (c). El patrón SAED típico para el área observada en el panel (a,d), 5 1/nm corresponde al vector de red real y el espacio recíproco.

La mayoría de las partículas (75%) tenían diámetros de 12-24 nm, y el 30% mostraban tamaños mayores de 12 nm y menores de 20 nm. La Figura 1 (d), es un

patrón SAED de la muestra de ZnO, con anillos irregulares asociados con los planos (100), (002), (102) y (110) de la estructura cristalina del óxido de zinc.

2.4.2 Efecto de las NPs ZnO sobre la germinación y el vigor de las semillas

En la Figura 2, se muestran los efectos de las NPs ZnO en variables asociadas con la calidad fisiológica de las semillas. Para el vigor, se puede observar una tendencia lineal creciente ($p \leq 0.01$); a medida que aumentaron las concentraciones de NPs ZnO, el vigor de la semilla mejoró (Figura 2 (a)).

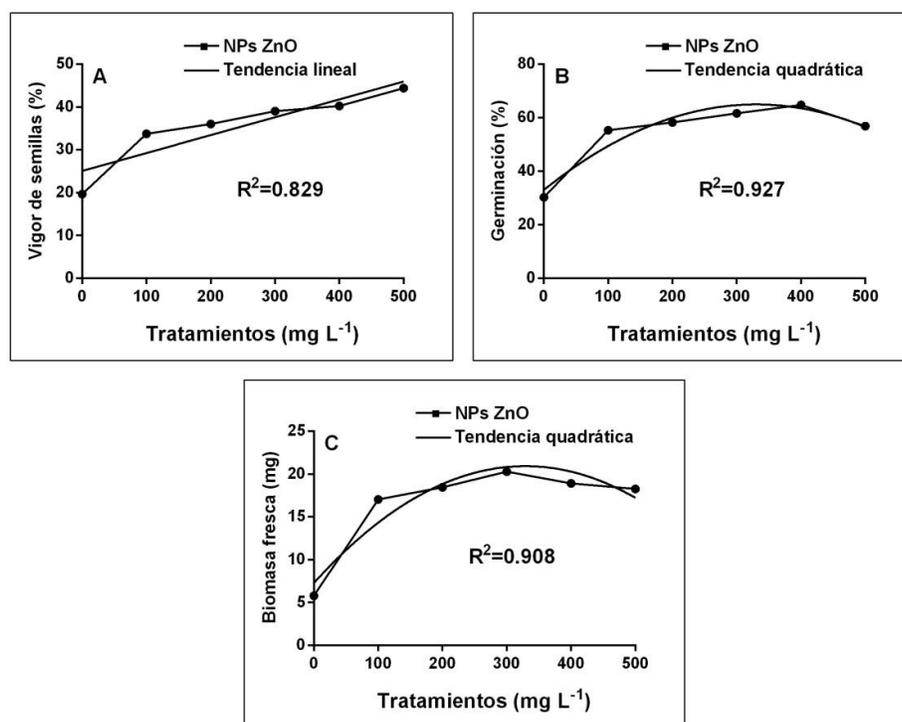


Figura 2. Dependencia de la concentración de NPs ZnO y análisis de polinomios ortogonales para V%, G % y biomasa fresca (mg).

El aumento más fuerte se encontró a una concentración de 500 mg L⁻¹, excediendo al tratamiento control (0 mg L⁻¹) en un 126%. Con respecto a la germinación y la biomasa fresca, se observan diferencias significativas ($p \leq 0.01$) y tendencias cuadráticas ($p \leq 0.01$). Es importante tener en cuenta que, a medida que los niveles de NPs ZnO aumentaron en un rango de 100-400 mg L⁻¹, la biomasa fresca se vio afectada positivamente (Figura 2 (b)). La biomasa máxima se alcanzó a 400 mg L⁻¹, ya que excedió el control (0 mg L⁻¹) en un 114%; a una concentración de 500 mg L⁻¹, se encontró una pequeña reducción en un 9% en comparación con 400 mg L⁻¹.

El crecimiento de las plántulas presentó una tendencia similar; a concentraciones de 100, 200 y 300 mg L⁻¹ hubo un aumento (Figura 2 (c)); el mayor crecimiento se alcanzó con 300 mg L⁻¹, excediendo el tratamiento de control (0 mg L⁻¹) en un 250%. Sin embargo, a 400 y 500 mg L⁻¹, hubo una ligera disminución (7% y 11%, respectivamente), en comparación con el tratamiento de 300 mg L⁻¹, en el que se observó el mayor efecto. Burman *et al.* (2013) informaron resultados análogos, ya que la respuesta máxima con respecto al peso seco del brote se observó en plántulas de garbanzo tratadas con 1.5 mg L⁻¹ de NPs ZnO, mientras que a 10 mg L⁻¹ las NPs ejercieron efectos opuestos en el crecimiento de la raíz. Esto también ha sido informado por Rameshraddy *et al.* (2017), quienes mostraron que la germinación y el crecimiento de las plántulas se estimulan a bajas concentraciones de NPs ZnO, mientras que las altas concentraciones pueden ser fitotóxicas. En el presente estudio, hubo una respuesta clara de las semillas de chile habanero a los tratamientos con NPs ZnO; se detectó un fuerte efecto en algunos rasgos fisiológicos

y bioquímicos. En la Figura 3, se muestran los efectos de las concentraciones de NPs ZnO sobre el vigor y el crecimiento de las plántulas.

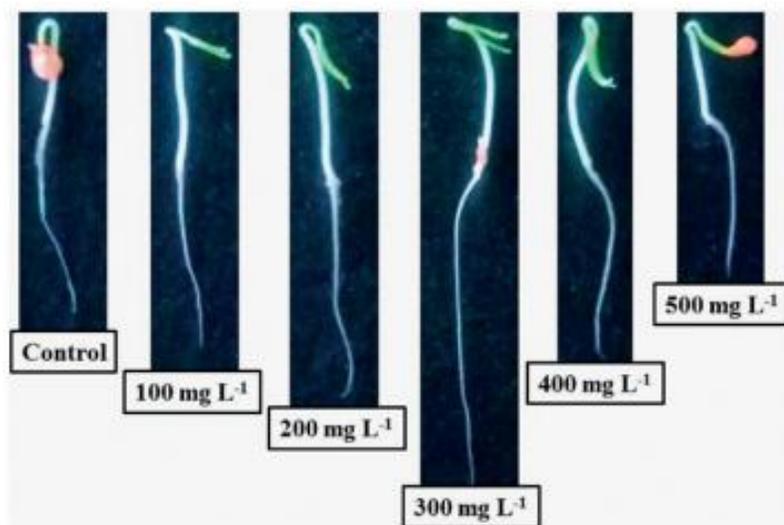


Figura 3. Longitud de plúmula y radícula de plántulas de *C. chinense* debido al efecto de cinco concentraciones de NPs ZnO.

Pandey *et al.* (2010) y Prasad *et al.* (2012), informaron previamente el efecto alentador de las NPs ZnO sobre la germinación en semillas de garbanzo y maní. La razón aparente del efecto estimulante sobre la germinación es la penetración de las NPs en las semillas, lo que permite la imbibición de Zn, agua y micronutrientes, acelerando la movilización de reservas que apoyan las primeras etapas del proceso de germinación (Lin y Xing, 2007). La presencia de NPs ZnO durante la germinación conduce a la biosíntesis de hormonas, especialmente a las auxinas y giberelinas, que promueven la movilización de reservas de las semillas, lo que resulta en plántulas con mayor longitud, así como la promoción del crecimiento y el rendimiento (El-Kereti *et al.*, 2013).

Krishna y Natarajan (2014), sugirieron que los efectos beneficiosos de las NPs ZnO podrían atribuirse a una mayor activación de enzimas como la amilasa α y β que son responsables de las reacciones metabólicas en la etapa de germinación. Además, el nivel de ácido acético indol en las raíces y los brotes podría aumentarse, lo que a su vez aumenta el vigor de la germinación y el crecimiento de las plántulas. Por lo tanto, la mejora de los caracteres asociados con la calidad fisiológica de las semillas se atribuye al hecho de que las NPs metálicas inducen reacciones de fotoesterilización y fotogeneración de ROS como aniones de superóxido e hidróxido que a su vez estimulan la penetración de iones y promueven la absorción de agua y oxígeno, necesaria para una mayor velocidad de germinación (Gokak y Taranath, 2015). Por otro lado, Hatami *et al.* (2014) declararon que la aplicación de NPs TiO₂ estimuló la germinación de plantas medicinales y aromáticas, pero esta respuesta dependía de la concentración con NPs y el genotipo de la planta.

Almutairi y Alharbi (2015), señalaron que el uso de nanomateriales está aumentando debido a su impacto positivo en diferentes sectores, incluida la agricultura. Cuando utilizaron NPs AG, se facilitó la aparición de plantas de *Zea mays*, *Citrullus lanatus* y *Cucurbita pepo*. El crecimiento y el rendimiento mejorados en algunos cultivos pueden estar relacionados con el valor nutricional de las NPs, especialmente para los micronutrientes esenciales para el crecimiento y la defensa (Servin *et al.*, 2015).

2.4.3 Longitud de plúmula y radícula

Los NPs ZnO influyeron positivamente en la longitud de la plúmula (Figura 4 (a)), alcanzando 4.5 cm a 300 mg L⁻¹, excediendo las plántulas del control en 3.4 cm, o 25%. A 400 y 500 mg L⁻¹, las longitudes de las plumulas fueron 4.3 cm o 4.5% más cortas que a 300 mg L⁻¹. La estimación del punto máximo para la función del modelo cuadrático fue 310 mg L⁻¹. La tendencia fue similar para el crecimiento de radícula, mostrando también un efecto cuadrático (Figura 4 (b)). El crecimiento de las radículas aumentó hasta 300 mg L⁻¹ de NPs ZnO, alcanzando 4 cm por encima del control (3.4 cm) en un 17%; mientras que a 400 y 500 mg L⁻¹ disminuyó en un 5% y 7% en comparación con 300 mg L⁻¹, el máximo estimado utilizando un modelo cuadrático (Figura 4).

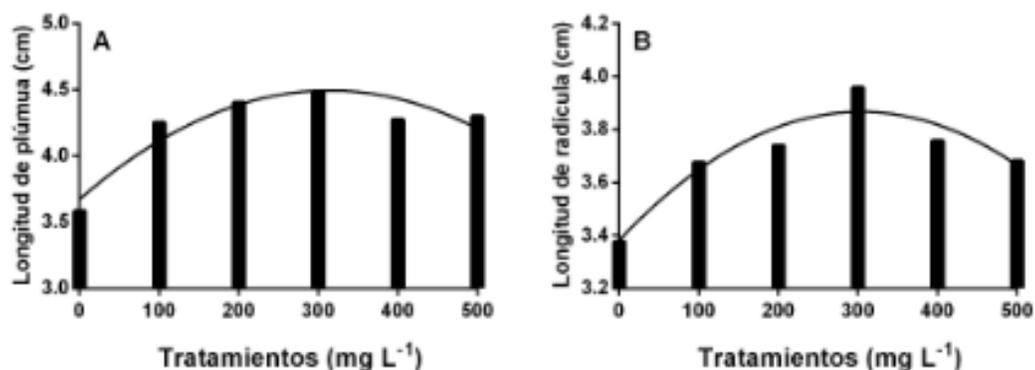


Figura 4. Regresión cuadrática lineal para las variables longitud de plúmula y radícula de las plántulas de *C. chinense*.

Es conocido, que las NPs ZnO promueven el crecimiento de plántulas y plantas (Siddiqui *et al.*, 2015). Prasad *et al.* (2012), mostraron que el tratamiento con NPs ZnO a 1000 mg L⁻¹ mejoró las propiedades fisiológicas y bioquímicas en las semillas de maní, lo que resultó en un aumento del vigor, así como en el

alargamiento de raíces y tallos, en contraste con el trabajo actual en el que la mayor concentración de NPs ZnO afectó negativamente las longitudes de las radículas. Este resultado está en línea con informes anteriores; por ejemplo, Boonyanitipong *et al.* (2011) declararon que a 500 mg L^{-1} de NPs ZnO inhibieron el alargamiento de las raíces de las plántulas de *Oryza sativa*. De manera similar, el efecto de las NPs ZnO en las plántulas de *Allium cepa* reveló que el desarrollo de las plántulas aumentó en concentraciones de 10 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs ZnO, disminuyendo en las concentraciones de 30 y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que sugiere efectos fitotóxicos (Raskar y Laware, 2014). Además, Lin y Xing (2007) demostraron que 2000 mg L^{-1} impidieron el crecimiento de las raíces en las plántulas de *Raphanus sativus* y *Lolium perenne*, notando que esto ocurrió durante la incubación de las semillas y no durante el período de imbibición.

En estudios realizados por Narendhran *et al.* (2016) declararon que la aplicación de NPs ZnO extendió la longitud de las raíces de *Sesamum indicum* a 0.1, 0.25 y 0.5 mg L^{-1} , y en concentraciones de 1.0 y 2.0 mg L^{-1} , describen una disminución. Sin embargo, es difícil establecer un modelo de respuesta de los efectos de NPs ZnO en la fisiología de las plantas, ya que el efecto depende de la especie y la concentración (Lin y Xing, 2007; Arruda *et al.*, 2015). Nuestros resultados sugieren que las bajas concentraciones de NPs ZnO ($100\text{--}300 \text{ mg L}^{-1}$) indujeron el crecimiento de la plántula y la radícula, mientras que las concentraciones más altas ($400\text{--}500 \text{ mg L}^{-1}$) inhiben el crecimiento de las plántulas (Figura 3).

2.4.4 Actividad enzimática antioxidante

Las actividades enzimáticas antioxidantes se analizaron para determinar los posibles efectos fitotóxicos de las NPs ZnO. En comparación con el control, todos los tratamientos con NPs ZnO implicaron un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en la actividad de POD (Figura 5 (a)).

La mayor actividad se detectó a la concentración de 400 mg L^{-1} ($4.7 \pm 0.5 \text{ U}_i \text{ mL}^{-1}$), siendo 2.3 veces o 135% mayor que el control ($2.0 \pm 0.4 \text{ U}_i \text{ mL}^{-1}$). Esto sugiere que las NPs ZnO estimularon el sistema de defensa antioxidante, siendo el primer efecto tóxico detectado cuando los NPs ingresan en semillas y plantas (López-Moreno *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2016). De manera similar, Dimpka *et al.* (2012) notaron que la aplicación de 500 mg L^{-1} a *Triticum aestivum* aumentó la actividad de POD. Esta enzima es parte del sistema de defensa antioxidante, convirtiendo H_2O_2 en agua y oxígeno, proporcionando protección contra el daño oxidativo (Manke *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2012).

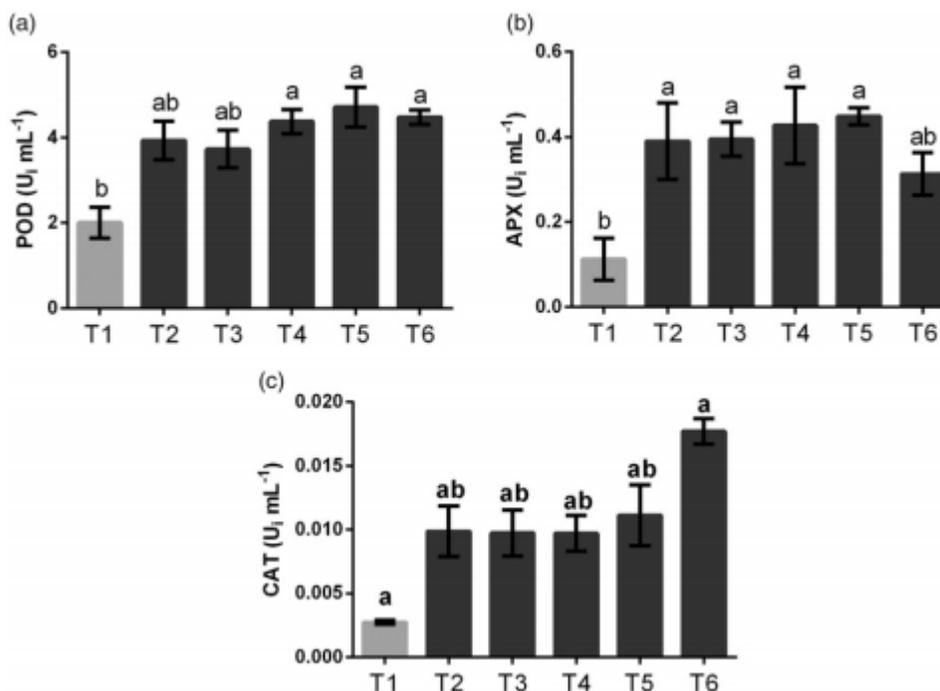


Figura 5. Actividad de las enzimas antioxidante en plántulas de *C. chinense* tratadas con NPs ZnO. (a) actividad de peroxidasa (POD), (b) actividad de ascorbato de peroxidasa (APX), (c) actividad de catalasa (CAT). T1 = 0 mg L⁻¹; T2 = 100 mg L⁻¹; T3 = 200 mg L⁻¹; T4 = 300 mg L⁻¹; T5 = 400 mg L⁻¹; T6 = 500 mg L⁻¹. Los valores son promedios de cuatro repeticiones (n = 4), las barras representan el error estándar de la media, diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

El aumento en las actividades APX y CAT (Figura 5 (b, c)) fue similar al de POD. Los NPs ZnO produjeron un aumento dependiente de la concentración en la actividad APX en las plántulas de *C. chinense*; a una concentración de 400 mg L⁻¹ se encontró un aumento de cuatro veces o 300% (0.45 ± 0.02 U_i mL⁻¹) en comparación con el control (0.11 ± 0.05 U_i mL⁻¹) y, a 500 mg L⁻¹ la actividad de APX disminuyó a 0.31 ± 0.05 U_i mL⁻¹. La actividad de CAT (Figura 5 (c)) a 500 mg L⁻¹ de NPs ZnO, obtuvo el valor máximo (0.18 ± 0.01 U_i mL⁻¹), superando en 6.4 veces (544%) en relación con el control (0.003 ± 0.0001 U_i mL⁻¹).

A medida que aumenta la cantidad de ROS, la actividad de APX se redujó. Curiosamente, en las mismas circunstancias, la actividad de la enzima CAT aumentó, lo que probablemente indica que el sistema de enzimas antioxidantes se está adaptando para contrarrestar la producción excesiva de ROS. Como se demostró anteriormente, cuando la concentración celular de ROS aumenta debido al estrés biótico y abiótico, el equilibrio de los sistemas de defensa antioxidante en las plantas se puede inhibir o modular para evitar el estrés oxidativo que causa la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la inhibición de las enzimas antioxidantes (Sharma *et al.*, 2012; Prakash y Chung, 2016).

2.5 Conclusiones

En este trabajo, todos los tratamientos con NPs ZnO tuvieron un efecto promotor en la germinación, así como en el vigor de las semillas y el crecimiento de las plántulas, por lo tanto, tienen un gran potencial para mejorar la agricultura como nanofertilizantes. El aumento de NPs ZnO en un rango de 0 a 300 mg L⁻¹, mejoró el desarrollo de plúmula y radícula, mientras que a 400 y 500 mg L⁻¹, presentó una disminución en ambos tejidos. Como resultado, las altas concentraciones de NPs ZnO podrían ser tóxicas para el crecimiento de las plantas de chile habanero. Los resultados también mostraron que al aumentar las concentraciones de NPs ZnO hubo un aumento significativo en la actividad de las enzimas antioxidantes, como POD, APX y CAT, asociadas con el estrés oxidativo. Estos resultados contribuyen a

explicar el efecto de las NPS ZnO sobre la germinación y el vigor de las semillas, además de los posibles efectos fitotóxicos en las plántulas.

2.6 Referencias

- Akanbi-Gada, M. A., Ogunkunle, C. O., Vishwakarma, V., Viswanathan, K., & Fatoba, P. O. 2019. Phytotoxicity of nano-zinc oxide to tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.): Zn uptake, stress enzymes response and influence on non-enzymatic antioxidants in fruits. *Environmental technology & innovation*, 14, 100325.
- Almutairi, Z. M., & Alharbi, A. 2015. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *J. Adv. Agric*, 4(1), 283-288.
- Arruda, S. C. C., Silva, A. L. D., Galazzi, R. M., Azevedo, R. A., & Arruda, M. A. Z. 2015. Nanoparticles applied to plant science: a review. *Talanta*, 131, 693-705.
- Asati, A., Pichhode, M., & Nikhil, K. 2016. Effect of heavy metals on plants: an overview. *Int. J. Appl. Innov. Eng. Manage*, 5, 2319-4847.
- Awasthi, A., Bansal, S., Jangir, L. K., Awasthi, G., Awasthi, K. K., & Awasthi, K. 2017. Effect of ZnO nanoparticles on germination of *Triticum aestivum* seeds. In *Macromolecular Symposia* 376(1), 1700043.
- Bhumi, G., Raju, R. Y., & Savithramma, N. 2014. Screening of zinc oxide nanoparticles for cell proliferation synthesized through *Adhatoda vasica nees*. *Int. J. Drug Dev. & Res*, 6(2), 97-104.
- Boonyanitipong, P., Kositsup, B., Kumar, P., Baruah, S., & Dutta, J. 2011. Toxicity of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germinating rice seed *Oryza sativa* L. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1(4), 282.
- Burman, U., Saini, M., & Kumar, P. 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(4), 605-612.
- Castro-Concha, L. A., Tuyub-Che, J., Moo-Mukul, A., Vazquez-Flota, F. A., & Miranda-Ham, M. L. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*. doi:10.1155/2014/809073.

- Chang, Y. N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., & Xing, G. 2012. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5(12), 2850-2871.
- Coll, C., Notter, D., Gottschalk, F., Sun, T., Som, C., & Nowack, B. 2016. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO₂, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). *Nanotoxicology*, 10(4), 436-444.
- Corral-Diaz, B., Peralta-Videa, J. R., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Morales, M. I., Osuna-Avila, P., & Gardea-Torresdey, J. L. 2014. Cerium oxide nanoparticles alter the antioxidant capacity but do not impact tuber ionome in *Raphanus sativus* (L). *Plant physiology and biochemistry*, 84, 277-285.
- Cota-Ruiz, K., Hernández-Viezcas, J. A., Varela-Ramírez, A., Valdés, C., Núñez-Gastélum, J. A., Martínez-Martínez, A., & Gardea-Torresdey, J. L. 2018. Toxicity of copper hydroxide nanoparticles, bulk copper hydroxide, and ionic copper to alfalfa plants: a spectroscopic and gene expression study. *Environmental pollution*, 243, 703-712.
- Davarpanah, S., Tehranifar, A., Davarynejad, G., Abadía, J., & Khorasani, R. 2016. Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruit yield and quality. *Scientia horticulturae*, 210, 57-64.
- Devipriya, D., & Roopan, S. M. 2017. *Cissus quadrangularis* mediated ecofriendly synthesis of copper oxide nanoparticles and its antifungal studies against *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 38-44.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Britt, D. W., & Anderson, A. J. 2013. Antifungal activity of ZnO nanoparticles and their interactive effect with a biocontrol bacterium on growth antagonism of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Biometals*, 26(6), 913-924.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P., & Anderson, A. J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9), 1125.
- Elavarthi, S., & B. Martin. 2010. "Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants." *Methods in Molecular Biology* 639:273-80.
- Elizabeth, A., Bahadur, V., Misra, P., Prasad, V. M., & Thomas, T. 2017. Effect of different concentrations of iron oxide and zinc oxide nanoparticles on growth and yield of carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 1266-1269.

- El-Kereti, M., A El-feky, S., S Khater, M., A Osman, Y., & A El-sherbini, E. S. 2013. ZnO nanofertilizer and He Ne laser irradiation for promoting growth and yield of sweet basil plant. *Recent patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 5(3), 169-181.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., & Fernández, M. D. 2018. Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown in a calcareous soil and an acidic soil. *Science of the total environment*, 644, 770-780.
- García-López, J.I., Lira-Saldivar, R. H., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Niño-Medina, G., Angélica Ruiz-Torres, N., & Díaz-Barriga, E. 2018. Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(5-7), 560-572.
- Ghosh, M., Jana, A., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A., Chakraborty, A., & Mukherjee, A. 2016. Effects of ZnO nanoparticles in plants: cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807, 25-32.
- Gokak, I. B., & Taranath, T. C. 2015. Seed germination and growth responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. exposed to zinc and zinc nanoparticles. *International Journal of Environmental Sciences*, 5(4), 840.
- Grillo, R., Abhilash, P. C., & Fraceto, L. F. 2016. Nanotechnology applied to bio-encapsulation of pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 1231-1234.
- Hao, Y., Cao, X., Ma, C., Zhang, Z., Zhao, N., Ali, A., & Xing, B. 2017. Potential applications and antifungal activities of engineered nanomaterials against gray mold disease agent *Botrytis cinerea* on rose petals. *Frontiers in plant science*, 8, 1332.
- Hao, Y., Z. Zhang, Y. Rui, J. Ren, T. Hou, S. Wu, M. Rui, F. Jiang, and L. Liu. 2016. "Effect of different nanoparticles on seed germination and seedling growth in rice." 2nd Annual International Conference on Advanced Material Engineering (AME 2016), 166–73.
- Hatami, M., Ghorbanpour, M., & Salehiarjomand, H. 2014. Nano-anatase TiO₂ modulates the germination behavior and seedling vigourity of some commercially important medicinal and aromatic plants. *Journal of Environment Biological*, 8(22), 53-59.

- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. "International Rules for Seed Testing." 243 p. By Michael Muschick, Zürichstrasse 50 P.O. Box 308 8303 Bassersdorf CH, Switzerland.
- Janmohammadi, M., & Sabaghnia, N. 2015. Effect of pre-sowing seed treatments with silicon nanoparticles on germinability of sunflower (*Helianthus annuus*). *Botanica Lithuanica*, 21(1), 13-21.
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., AlMutairi, K. A., & Siddiqui, Z. H. 2017. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 194-209.
- Krishna, K. K., & Natarajan, N. 2014. Customizing zinc oxide, silver and titanium dioxide nanoparticles for enhancing groundnut seed quality. *Indian Journal of Science and Technology*, 7(9), 1376-1381.
- Kwak, S. S., Kim, S. K., Lee, M. S., Jung, K. H., Park, I. H., & Liu, J. R. 1995. Acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry*, 39(5), 981-984.
- Laware, S. L., & Raskar, S. 2014. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth, flowering and seed productivity in onion. *International Journal of Current Microbiology Science*, 3(7), 874-881.
- Lin, D., & Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243-250.
- Liu, R., & Lal, R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*, 514, 131-139.
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Cruz-Jiménez, G., Castellano, L., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. 2017. Effect of ZnO nanoparticles on corn seedlings at different temperatures; X-ray absorption spectroscopy and ICP/OES studies. *Microchemical Journal*, 134, 54-61.
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J. Á., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental science & technology*, 44(19), 7315-7320.
- Mahendra, S., Zhu, H., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. 2008. Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environmental science & technology*, 42(24), 9424-9430.

- Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. 2013. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*, 2013.
- Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. 2017. Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in plant science*, 8, 832.
- Mukherjee, A., Sun, Y., Morelius, E., Tamez, C., Bandyopadhyay, S., Niu, G., & Gardea-Torresdey, J. L. 2016. Differential toxicity of bare and hybrid ZnO nanoparticles in green pea (*Pisum sativum* L.): A life cycle study. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1242.
- Nakano, Y., & Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Narendhran, S., Rajiv, P., & Sivaraj, R. 2016. Toxicity of ZnO nanoparticles on germinating *Sesamum indicum* (Co-1) and their antibacterial activity. *Bulletin of Materials Science*, 39(2), 415-421.
- Narendhran, S., Rajiv, P., & Sivaraj, R. A. 2016. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth of *Sesamum indicum* L. in zinc deficient soil. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8(3), 365-371.
- Pandey, A. C., S. Sanjay, S., & S. Yadav, R. 2010. Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental nanoscience*, 5(6), 488-497.
- Pinedo-Guerrero, Z. H., Hernández-Fuentes, A. D., Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., & Cadenas-Pliego, G. 2017. Cu nanoparticles in hydrogels of chitosan-PVA affects the characteristics of post-harvest and bioactive compounds of jalapeño pepper. *Molecules*, 22(6), 926.
- Prakash, M. G., & Chung, I. M. 2016. Determination of zinc oxide nanoparticles toxicity in root growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Acta Biologica Hungarica*, 67(3), 286-296.
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., & Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*, 35(6), 905-927.
- Priester, J. H., Ge, Y., Mielke, R. E., Horst, A. M., Moritz, S. C., Espinosa, K., & Schimel, J. P. 2012. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), E2451-E2456.

- Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. 2018. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant physiology and biochemistry*, 132, 120-127.
- Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kim, B., Barrios, A. C., Medina-Velo, I. A., & Gardea-Torresdey, J. L. 2018. Finding the conditions for the beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants-A review. *Environmental Pollution*, 241, 1175-1181.
- Qados, A. M. A. 2015. Mechanism of nanosilicon-mediated alleviation of salinity stress in faba bean (*Vicia faba* L.) plants. *American Journal of Experimental Agriculture*, 7(2), 78-95.
- 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(12), 1584-1594.
- Rameshraddy, G. J., Pavithra, G. J., Mahesh, S., Geetha, K. N., & Shankar, A. G. 2017. Seed priming and foliar spray with nano zinc improves stress adaptability and seed zinc content without compromising seed yield in ragi (*Finger millet*). *Int. J. Pure Appl. Biosci*, 5, 251-258.
- Raskar, S. V., & Laware, S. L. 2014. Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2), 467-73.
- Rawat, P. S., Kumar, R., Ram, P., & Pandey, P. 2018. Effect of nanoparticles on wheat seed germination and seedling growth. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 12(1), 13-6.
- Razzaq, A., Ammara, R., Jhanzab, H. M., Mahmood, T., Hafeez, A., & Hussain, S. 2015. A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. *Journal of Nanoscience and Technology*, 55-58.
- Rossi, L., Fedenia, L. N., Sharifan, H., Ma, X., & Lombardini, L. 2019. Effects of foliar application of zinc sulfate and zinc nanoparticles in coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Plant physiology and biochemistry*, 135, 160-166.
- Salem, A. S., Hamzah, A. M., & El-Taweelah, N. M. 2015. Aluminum and zinc oxides nanoparticles as a new method in controlling the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbest) compared to Malathion insecticide. *International Journal of Scientific Research in Agricultural Sciences*, 2, 1-6.

- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., & Dimkpa, C. 2015. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2), 92.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K., & Arora, S. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(8), 2225-2233.
- Siddiqui, M. H., M. H. Al-Whaibi, M. Firoz, and M. Y. Al-Khaishany. 2015. "Role of nanoparticles in plants". In *nanotechnology and plant sciences*, edited by Manzer H. Siddiqui, Mohamed H. Al-Whaibi, and Firoz Mohammad, 19–35. Heidelberg: Springer International Publishing 305.
- 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. *Journal of materials science*, 53(1), 185-201.
- Singh, A., Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., & Yadav, V. 2017. Synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its impact on germination of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. *Tropical Plant Biology*, 4(2), 246-253.
- Singh, D., & Kumar, A. 2016. Impact of irrigation using water containing CuO and ZnO nanoparticles on *Spinach oleracea* grown in soil media. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97(4), 548-553.
- Singh, V. P., Singh, S., Kumar, J., & Prasad, S. M. 2015. Investigating the roles of ascorbate-glutathione cycle and thiol metabolism in arsenate tolerance in ridged *Luffa* seedlings. *Protoplasma*, 252(5), 1217-1229.
- Venkatachalam, P., Priyanka, N., Manikandan, K., Ganeshbabu, I., Indiraarulsevi, P., Geetha, N., & Sahi, S. V. 2017. Enhanced plant growth promoting role of phycomolecules coated zinc oxide nanoparticles with P supplementation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant physiology and biochemistry*, 110, 118-127.
- Verma, S. K., Das, A. K., Patel, M. K., Shah, A., Kumar, V., & Gantait, S. 2018. Engineered nanomaterials for plant growth and development: a perspective analysis. *Science of the Total Environment*, 630, 1413-1435.
- Yang, J., Cao, W., & Rui, Y. 2017. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. *Journal of plant interactions*, 12(1), 158-169.

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. *Frontiers in plant science*, 7, 535.

CAPÍTULO 3: LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC AUMENTAN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Capsicum annuum* L. DURANTE LA GERMINACIÓN

García-López, J.I.¹; Zavala-García, F.¹; Olivares-Sáenz, E.¹; Lira-Saldívar, R.H.²; Díaz Barriga-Castro, E.²; Ruiz-Torres, N.A.³; Ramos-Cortez, E.⁴; Vázquez-Alvarado, R.¹; Niño-Medina, G.¹. Zinc Oxide Nanoparticles Boosts Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Capsicum annuum* L. during germination. *Agronomy* 2018, 8, 215. Doi: [org/10.3390/agronomy8100215](https://doi.org/10.3390/agronomy8100215)

(Publicado en *Agronomy Journal* el 03 de Octubre 2018, Apéndice 2)

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Química y Bioquímica, Francisco Villa S/N, Col. Ex-Hacienda el Canadá, C.P. 66050 General Escobedo, Nuevo León, Mexico.

²Centro de investigación en Química Aplicada, Departamento de Agroplasticultura, Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coahuila.

³Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro. No.1923, Buenavista, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila.

⁴Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66451, México

*Autor de correspondencia: guillermo.ninomd@uanl.edu.mx

3.1 Resumen

En esta investigación se determinaron los efectos de las nanopartículas de óxido de zinc sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Capsicum annuum* L. También, se determinó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados, así como la capacidad antioxidante del 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH). Los resultados indicaron que los tratamientos con

nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) mejoraron la tasa de germinación de las semillas durante los primeros siete días. La germinación del vigor de la semilla aumentó en 123.5%, 129.4% y 94.1% con suspensiones de NPs ZnO a 100, 200 y 500 ppm, respectivamente. Los parámetros morfológicos probados revelaron que los tratamientos con NPs ZnO no afectaban significativamente el desarrollo de la plúmula, pero tenían un impacto significativo ($p \leq 0.01$) en la longitud de la radícula. Las suspensiones a 100, 200 y 500 ppm de NPs ZnO inhibieron el crecimiento de la radícula de las plántulas y promovieron la acumulación de compuestos fenólicos, con un efecto un fitotóxico en este órgano. Los resultados sugirieron que las NPs ZnO influyeron en el vigor de las semillas, desarrollo de las plántulas y promueven la acumulación de compuestos fenólicos deseables en la radícula.

3.2 Introducción

La nanotecnología ha llamado la atención de los investigadores en los últimos años. El término "nanotecnología" puede definirse como el diseño, síntesis, manipulación y aplicación de agregados atómicos o moleculares con una dimensión entre 1 y 100 nm (Hajra *et al.*, 2017). La metodología y el procesamiento de ingeniería que producen nanopartículas metálicas (NPs) alteran sus propiedades físicas y químicas, así como su reactividad, debido a su pequeño tamaño y alta relación de volumen superficial (Anusuya *et al.*, 2016). Esta nueva tecnología de nanomateriales se ha aplicado a las prácticas agrícolas modernas, con el uso de pesticidas sintéticos y fertilizantes en la nueva revolución verde (Lira-Saldívar *et al.*, 2018).

En consecuencia, se ha desarrollado una variedad de NPs basadas en metales como el hierro (Fe), cobre (Cu), plata (Ag), zinc (Zn) y polímeros de óxido de metal como el óxido de zinc (ZnO) y el dióxido de titanio (TiO₂) para usos agrícolas como nanofertilizantes (Liu y Lal, 2015). Dado que el ZnO desempeña un papel vital en las respuestas fisiológicas y anatómicas, las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) se utilizan principalmente en aplicaciones agrícolas (Agarwal *et al.*, 2017). El ZnO participa en la regulación del metabolismo hormonal: modifica los niveles de auxina a través de la biosíntesis de triptófano y es esencial para la activación de varias enzimas, como la superóxido dismutasa y las deshidrogenasas (Narendhran *et al.*, 2016).

Las NPs ZnO podrían aplicarse potencialmente como agentes bacteriostáticos para controlar la propagación y la infección de patógenos (Raskar y Laware, 2014), así como para mejorar la germinación de las semillas, el índice de vigor de las plántulas, la longitud de la plúmula y la radícula (Singh *et al.*, 2016). En los últimos años, se ha confirmado la acción promotora en la germinación de semillas en diversas especies con la aplicación de NPs ZnO (Zafar *et al.*, 2016). Sin embargo, algunos autores han informado sobre los efectos fitotóxicos de las NPs ZnO (Burman *et al.*, 2013). La fitotoxicidad es una preocupación principal en la aplicación de nanomateriales durante la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas (Yang *et al.*, 2015), debido a que la germinación de semillas es particularmente sensible a las condiciones de estrés. La aplicación de NPs ZnO, como nanofertilizantes puede

producir cambios tóxicos en la actividad biológica como la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Xiang *et al.*, 2015).

Las NPs inducen estrés oxidativo en los tejidos, lo que puede desencadenar su metabolismo y dar como resultado una mayor producción de metabolitos secundarios y una mejor actividad antioxidante (Večeřová *et al.*, 2016). Estos fitoquímicos son responsables de la neutralización de los radicales libres tóxicos y la prevención de reacciones de oxidación excesiva (Franklin *et al.*, 2009). Sin embargo, el mecanismo de fitotoxicidad de las NPs ZnO durante la germinación y el crecimiento de las plántulas no se ha establecido (Marslin *et al.*, 2017).

Pruebas recientes sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plantas tratadas con diferentes tipos y concentraciones de NPs han demostrado su posible fitotoxicidad a corto plazo (Awasthi *et al.*, 2017). Sin embargo, ningún estudio ha abordado específicamente los efectos de las NPs ZnO sobre la biosíntesis de diferentes tipos de metabolitos secundarios y su efecto biológico sobre la germinación de semillas y el crecimiento temprano de las plántulas de *Capsicum annuum* L. Por lo tanto, esta investigación empleó *Capsicum annuum* L. como modelo para definir los efectos de las NPs ZnO en la germinación de semillas, el crecimiento de las plántulas, la biosíntesis de compuestos fenólicos (fenoles totales, flavonoides y taninos condensados) y la capacidad antioxidante del DPPH de los extractos de plántulas expuestas a NPs ZnO.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Material vegetal

La variedad de *Capsicum annuum* L. empleada en esta investigación fue San Luis (Hydro Environment, Tlalpan, México). Esta variedad produce frutos grandes (12 a 15 cm de largo en promedio). La planta es muy vigorosa y su dosel proporciona una excelente cobertura. La cosecha es semi-concentrada y uniforme, y se recomienda para el consumo en el mercado fresco y el procesamiento de deshidratación.

3.3.2 Caracterización de las NPs ZnO

Las NPs ZnO se compraron en materiales Nanoestructurados y Amorfos Inc. (Houston, TX, USA). Las NPs se caracterizaron morfológica y estructuralmente por microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y difracción de área seleccionada (SAED) utilizando un microscopio FEI-TITAN 80–300kV operado a un voltaje de aceleración de 300kV (FEI-TITAN 80– 300 kV, Fisher Scientific, Hillsboro, OR, USA). Las micrografías TEM y HRTEM fueron procesadas por el software de transformación Fast Fourier (Digital Micrograph 3.7.0, Gatan Software, Pleasanton, CA, USA).

3.3.3 Tratamientos

Las suspensiones de NPs ZnO se prepararon a 100, 200 y 500 ppm en base a los estudios realizados por Sheteiwy *et al.* (2016) y Salah *et al.* (2015). Para garantizar una dispersión uniforme, todas las suspensiones se sonicaron con un sonicador Q500 (Qsonica Newtown, CT, USA) durante 25 min a 120 voltios-3 amps, y de 50 a 60 Ghz. El proceso de preparación de las suspensiones con NPs ZnO se realizó en base a una metodología ya establecida por Pullagurala *et al.* (2018).

3.3.4 Germinación de semillas y crecimiento de plántulas

Las semillas se contaron en lotes de 100 por tratamiento y con unas pinzas se colocaron en una placa de Petri (15 cm x 20 cm), encima de dos capas de papel de filtro (Whatman, 90 mm de diámetro). Posteriormente, se aplicaron cuatro tratamientos como suspensiones de NPs ZnO, 0 ppm (T1 control, tratado con agua destilada), 100 ppm (T2), 200 ppm (T3) y 500 ppm (T4). Diez mililitros de cada tratamiento con suspensiones de NPs ZnO se tomaron con una pipeta (Pipetman Classic 1-10 mL) y se agregaron a las semillas para su imbibición. Luego se colocaron las placas de Petri durante 72 h en una cámara de crecimiento (Equitec EGCS 3S, 301 3SHR, Guadalajara, México) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Una vez que se completó el período de imbibición de semillas, se plantaron cuatro réplicas de 25 semillas por repetición para cada tratamiento en una hoja de papel Anchor (Seedburo Equipment Company, Des Plaines, IL, USA). El papel se humedeció con agua destilada y las semillas se colocaron horizontalmente sobre el papel, asegurando que el embrión se orientará hacia abajo. Luego se humedeció otra hoja de papel para cubrir las semillas. Posteriormente, las hojas se doblaron en un rollo, de aproximadamente 4 cm de ancho. Una vez enrolladas, las láminas se colocaron en cestas de tereftalato de polietileno (20 cm x 45 cm). Las cestas se volvieron a colocar en una cámara de prueba EGCHS 301 (Equitec, Madrid, España) a 25 °C y 75% de humedad relativa durante 14 días.

El bioensayo siguió los protocolos de la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (ISTA, 2004) con algunas modificaciones. El vigor de germinación (V%) se calculó como porcentaje de plántulas normales del número total. La tasa de germinación (G%) se determinó como porcentaje de semillas germinadas del número total de semillas. Ambas variables se registraron a los 7 y 14 días después de la siembra. Se consideró una plántula normal aquella que tenía una longitud de plúmula y radícula con al menos 2.0 cm. Las plántulas normales fueron aquellas que tenían raíz y plúmula, cada una de ellas con un desarrollo total de 2.0 cm. La longitud de la plúmula se midió desde la intersección raíz-hipocotilo hasta la base del cotiledón, mientras que la longitud de la radícula se midió desde la base del hipocotilo hasta el ápice de la radícula. El peso de la biomasa seca para cada repetición se determinó

14 días después de la siembra con un balanza analítica y se expresó en mg plántula⁻¹ de acuerdo con Corral-Díaz *et al.* (2014).

3.3.5 Extracción de compuestos fenólicos libres

La acumulación de biomasa seca se usó para cuantificar compuestos fenólicos y para medir la actividad antioxidante de acuerdo con Lopez-Contreras *et al.* (2015). Los tejidos secos de plúmula y radícula, se molieron y se tamizaron para obtener un tamaño de partícula ≤ 0.5 mm (malla 35). Enseguida, cien miligramos de muestra se homogeneizaron con 3 mL de metanol al 80% en un tubo de cultivo con tapón de rosca, y se agitó durante 1 h a 200 rpm. Después de eso, las muestras se centrifugaron a 4500 x g, los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -20 °C hasta que se usaron para el análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

3.3.6 Contenido de fenoles totales

Para este procedimiento, se tomaron 0.2 mL del extracto, y se agregaron 2.6 mL de agua destilada y 0.2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 min, se añadieron 2 mL de Na₂CO₃ al 7% y la solución se agitó durante 30 s. La solución se colocó en la oscuridad durante 90 min y se midió la absorbancia a 750 nm. El contenido total de fenoles se informó en miligramos de ácido gálico equivalente por kilogramo de

muestra (mgGAE kg^{-1}), calculado a partir de la curva de calibración de ácido gálico de 0 a 200 mg L^{-1} .

3.3.7 Contenido de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales se basó en la reacción del complejo $\text{AlCl}_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$, donde se tomaron 0.2 mL del extracto y se agregaron 3.5 mL de agua destilada. Enseguida se añadieron 0.15 mL de NaNO_2 al 5%, 0.15 mL de AlCl_3 al 10% y 1 mL de NaOH 1 M, a intervalos de 5 min cada uno. La reacción se dejó durante 15 min y después de eso, se midió la absorbancia a 510 nm. El contenido total de flavonoides se informó en miligramos de equivalente de catequina por kilogramo de muestra (mgCatE kg^{-1}), calculado a partir de la curva de calibración de catequina de 0 a 200 mg L^{-1} .

3.3.8 Contenido de taninos condensados

El contenido de taninos condensados se determinó mediante la reacción del complejo vanillin- H_2SO_4 . Del extracto, se tomaron 0.25 mL y se agregaron 0.65 mL de vanillin al 1%; luego, se añadieron 0.65 mL de H_2SO_4 al 25% (la vainillina y el H_2SO_4 se disolvieron en metanol). La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 30°C , y se midió la absorbancia a 500 nm. El contenido de taninos condensados se informó en miligramos de equivalente de catequina por kilogramo de muestra

(mgCatE kg⁻¹), calculado a partir de la curva de calibración de catequina de 0 a 200 mg L⁻¹.

3.3.9 Determinación de la capacidad antioxidante de DPPH

La capacidad antioxidante se midió mediante la reducción de la absorbancia del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) en presencia del extracto. Se preparó una solución de DPPH 60 µM en metanol al 80% y su absorbancia fue de 0.95 a 517 nm. Las muestras se analizaron mezclando 0.05 mL del extracto con 1.5 mL de la solución de trabajo DPPH, se permitió que la reacción continuara durante 30 min y posteriormente se tomó su lectura de absorbancia. La capacidad antioxidante se informó en milimoles equivalentes de Trolox por kilogramo de muestra (mmolTE kg⁻¹), en base a la curva de calibración previamente realizada con Trolox a concentraciones de 0 a 500 mmol L⁻¹.

3.3.10 Análisis estadístico

El experimento se configuró utilizando un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. El modelo lineal general fue $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$, donde Y_{ij} = la variable de respuesta; μ = media general; α_i = efecto de las concentraciones con NPs ZnO; e_{ij} = error experimental. La unidad experimental consistió en un rollo de papel Anchor que contenía 25 semillas. Los resultados se informaron como media \pm desviación estándar de cuatro muestras. La diferencia estadísticamente

significativa entre las muestras se analizó con un ANOVA y las medias de los tratamientos se compararon con una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Caracterización de NPs ZnO

La Figura 6a muestra una imagen TEM típica para una muestra de NPs ZnO. La morfología de las NPs es cuasi esférica, como muestra la micrografía. Estas NPs aparecen bien dispersas dentro de la cuadrícula TEM. La Figura 6b muestra una imagen HRTEM característica de una nanopartícula. En esta imagen, las franjas reticulares se observan claramente con una separación de 2.81 Å, que corresponde a los planos reticulares de una estructura hexagonal de óxido de zinc. La figura 6c muestra la distribución de tamaños de las NPs calculados a partir de más de 300 partículas.

La mayoría de las partículas en esta muestra (~75%) tienen diámetros entre 12 y 24 nm, y ~30% son mayores que 12 nm y menores que 20 nm. La figura 6d muestra un patrón SAED común de la muestra de ZnO. Este patrón muestra anillos irregulares asociados con los planos (100), (002), (102) y (110) de la estructura cristalina del óxido de zinc. El patrón SAED se asoció a una fase cristalina de óxido de zinc.

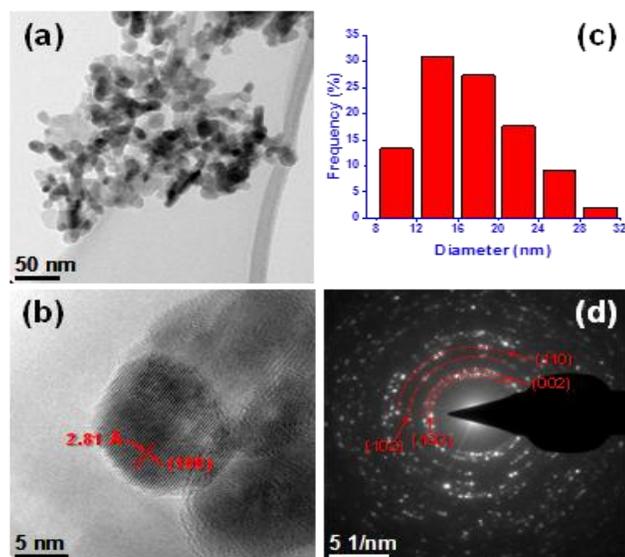


Figura 6. Las micrografías muestran una muestra de nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO). (a) Imagen típica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una nanopartícula, (b) Micrografía típica de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de una nanopartícula, (c) Distribución de tamaños de NPs (d) Difracción de área típica seleccionada (SAED), patrón obtenido para el área observada en el panel (a).

3.4.2 Efecto de las NPs ZnO sobre la germinación y el vigor

La Figura 7B muestra que el porcentaje de germinación no tuvo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.596$). Sin embargo, el vigor de germinación en el séptimo día mostró efectos significativos ($p \leq 0.05$): el vigor a 100 y 200 ppm fue de 50.66% y 52.00%, respectivamente (Figura 7A). Estos valores superaron al tratamiento control (0 ppm) en 123.5% y 129.4%, respectivamente. Sin embargo, a una concentración de 500 ppm, el vigor de germinación disminuyó en un 15.4% en comparación con el tratamiento de mayor rendimiento (200 ppm).

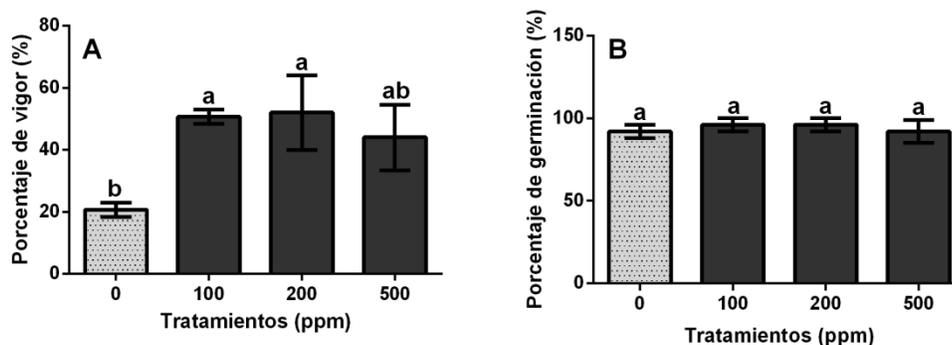


Figura 7. Porcentajes de vigor (A) y germinación (B) en semillas de *C. annuum* tratadas con NPs ZnO a diferentes concentraciones (0, 100, 200 y 500 ppm). Las barras representan la media ($n = 4$) \pm desviación estándar. Las diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) y representan las diferencias entre tratamientos.

Estos resultados indican que la aplicación de NPs ZnO a 100 ppm y 200 ppm aumenta la velocidad de emergencia de la plúmula y la radícula durante los primeros siete días. Sin embargo, esta respuesta depende de la concentración, ya que a 500 ppm de NPs ZnO se observó una disminución en el vigor. Los efectos beneficiosos de NPs ZnO durante la germinación conducen a la biosíntesis de hormonas, especialmente auxinas y giberelinas, que promueven la degradación de las reservas de semillas y el aumento del vigor de las semillas (El-Kereti *et al.*, 2013).

En estudios realizados en semillas y plántulas de ragi (*Finger millet*) los efectos de las NPs ZnO resultaron en un incremento del 45.54% en el vigor de la semilla, a una concentración de 1000 ppm, mientras que a 1500 ppm se observó una reducción significativa de este parámetro (Rameshraddy *et al.*, 2017). Se encontraron resultados similares en las semillas de *Capsicum annuum* L. expuestas a 0.75 g de NPs ZnO, con un aumento significativo del 67% en el índice de vigor (Afrayeem y

Chaurasia, 2017). El efecto de las NPs ZnO durante la germinación y el crecimiento de plántulas ha sido reportado anteriormente, sin embargo, algunos resultados de las investigaciones señalan efectos positivos, mientras que otros señalan efectos fitotóxicos. La variabilidad de respuesta, se debe principalmente a la naturaleza de las NPs, tamaño, concentración y el genotipo (Hatami *et al.*, 2014).

3.4.3 Efecto de las NPs ZnO en el crecimiento de las plántulas

En el Cuadro 1, se muestra el efecto de las NPs ZnO en las variables asociadas al crecimiento de las plántulas. La longitud de la plúmula no se vio afectada significativamente ($p \leq 0.724$). Sin embargo, la longitud de la radícula respondió significativamente ($p \leq 0.01$) a las concentraciones de NPs ZnO: a medida que aumentaba la concentración, la longitud de la radícula disminuía en un 50% (100 ppm), 53.9% (200 ppm) y 54.5% (500 ppm).

La misma tendencia se observó para el peso de biomasa seca. Aunque los tratamientos fueron estadísticamente iguales ($p \leq 0.155$), la acumulación de biomasa seca disminuyó gradualmente en concentraciones de 100 a 500 ppm (Cuadro 1). La mayor reducción se obtuvo con 500 ppm, siendo 8.5% menor que el tratamiento control (0 ppm). Estos resultados indican que el crecimiento de la radícula se ve muy afectado por los tratamientos con NPs ZnO (Figura 8).

Cuadro 1. Efecto de las NPs ZnO en la longitud de plúmula, radícula y la biomasa seca de las plántulas

Tratamientos (ppm)	Longitud de plúmula (cm)	Longitud de radícula (cm)	Biomasa seca de plántulas (mg plántula ⁻¹)
0	3.29 ± 0.37 a	11.32 ± 2.48 a	45.73 ± 3.79 a
100	3.65 ± 0.30 a	5.66 ± 1.40 b	44.13 ± 0.88 a
200	3.46 ± 0.39 a	5.22 ± 1.65 b	42.87 ± 4.57 a
500	3.41 ± 0.30 a	5.15 ± 1.47 b	41.84 ± 5.02 a

Los valores son el promedio de cuatro repeticiones. Medias (n = 4) ± desviación estándar. Las diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) y representan las diferencias entre tratamientos.

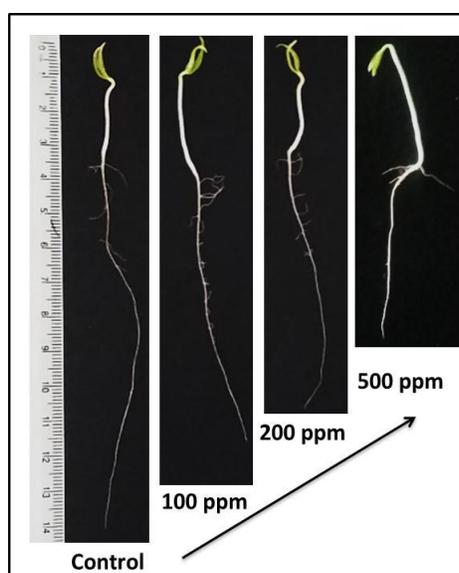


Figura 8. Efecto de las NPs ZnO en el crecimiento de plántulas de *C. annuum*. Cada plántula es representativa de una unidad experimental.

El índice de crecimiento de la radícula se usa ampliamente como un indicador de fitotoxicidad, ya que es altamente sensible a las condiciones de estrés (Ali *et al.*, 2015). La radícula es la primera estructura del embrión de la semilla y, por lo tanto, es el primer tejido expuesto a concentraciones excesivas de NPs ZnO (Xiang *et al.*, 2015). Por esta razón, los efectos adversos fueron más marcados en raíces que en

los brotes, lo que sugiere que la elongación de la raíz fue más sensible a la toxicidad de NPs ZnO que la elongación de los brotes (Ma *et al.*, 2010).

La variación en el crecimiento de radícula se puede deber a la presencia de NPs ZnO o del ion de zinc disuelto, que interfiere con la bioquímica y fisiología de la raíz generando variación en longitud de radícula y la acumulación de materia seca. Diferentes estudios en: rábano, ballica, lechuga, pepino y arabidopsis concuerdan con nuestros resultados sobre la inhibición y variación en el crecimiento de la raíz (Lin y Xing, 2007; Lee *et al.*, 2013).

Esta inhibición puede atribuirse a dos efectos principales: (1) una toxicidad química en base a la liberación de iones (tóxicos) en este caso a la penetración de partículas de tamaño nano y también a la disolución los iones de Zn^{++} ; (2) el estrés o estímulos causados por la superficie, el tamaño y/o forma de las partículas (Lee *et al.*, 2010). Estudios realizados por Zhang *et al.* (2015) señalaron la fitotoxicidad de las NPs ZnO sobre la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) y de pepino (*Cucumis sativus* L.), sus resultados indicaron la inhibición en el desarrollo de la radícula por presencia de NPs ZnO. En este estudio, los resultados indican que los tratamientos con NPs ZnO solo afectaron la morfología de la radícula, debido a un efecto fitotóxico que causó estrés oxidativo y dio como resultado una mayor acumulación de compuestos fenólicos en este tejido de la plántula (Sewelam *et al.*, 2016).

3.4.4 Efecto de las NPs ZnO en el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del DPPH

Los resultados indican que el contenido de compuestos fenólicos en la plúmula no se vio afectado por la aplicación de NPs ZnO a las semillas (Figura 9). Por el contrario, hubo un efecto significativo ($p \leq 0.01$) en la acumulación de compuestos fenólicos en la radícula, ya que el aumento en las concentraciones de NPs ZnO de 100 a 500 ppm, estimuló la acumulación de fenoles totales en 350.84 ± 23.99 (100 ppm), 493.80 ± 2.86 (200 ppm) y 539.11 ± 159.70 (500 ppm) mgGAE kg^{-1} . (Figura 9A), superando la acumulación del tratamiento control (0 ppm) en 148.5%, 249.9% y 282%, respectivamente.

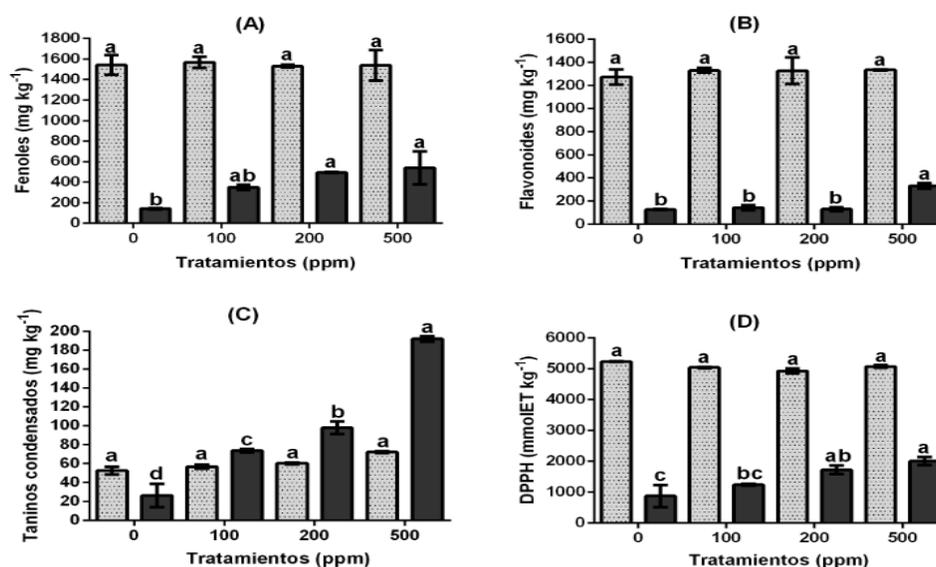


Figura 9. Contenido fenólico en plántulas de *C. annuum* tratadas con NPs ZnO. (A) Fenoles totales, (B) Flavonoides, (C) Taninos condensados y (D) Capacidad antioxidante (DPPH) (milimoles equivalentes de Trolox por kilogramo de muestra (mmol ET kg^{-1})). Los valores son el promedio de cuatro repeticiones. Medias ($n = 4$), las barras representan la desviación estándar de la media. Las diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) y representan las diferencias entre los tratamientos.

Este comportamiento también se observó para el contenido de flavonoides totales y taninos condensados (Figura 9 B y C). Las plántulas tratadas con 500 ppm de NPs ZnO acumularon la mayor concentración de flavonoides totales y taninos condensados con 331.84 ± 25.34 y 191.95 ± 2.86 mg CatE kg^{-1} , respectivamente, superando en 164.4% y 627.7% al tratamiento de control (0 ppm). La Figura 9D muestra los resultados para la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH. Los valores de la capacidad antioxidante del DPPH para plúmula fueron en un rango de 4932 ± 73.85 a 5231 ± 15.23 mmolET kg^{-1} , pero no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

Por otra parte, la capacidad antioxidante de las radículas se vio afectada significativamente ($p \leq 0.01$), los valores más altos se obtuvieron a 500 ppm de NPs ZnO, con un valor de 2002.14 ± 127.88 mmolET kg^{-1} , superando en 129.1% al tratamiento control (0 ppm). Este comportamiento es similar al observado con la acumulación de compuestos fenólicos totales en la radícula, ya que la concentración más alta se obtuvo con el tratamiento a 500 ppm de NPs ZnO.

En este estudio, las concentraciones de NPs ZnO en un rango de 100 a 500 ppm afectaron negativamente el crecimiento de la raíz y también llevaron a un aumento en la acumulación de compuestos antioxidantes no enzimáticos, como fenoles totales, flavonoides y taninos condensados. Se informaron resultados similares al aplicar NPs ZnO a semillas de *Brassica nigra*, obteniendo un efecto negativo en el crecimiento de la raíz, resultando en un aumento del 79% de la actividad de

captación de radicales del DPPH (Zafar *et al.*, 2016). En plantas de papa, la aplicación de NPs ZnO aumentó los compuestos fenólicos totales en 1%, 20% y 22% a concentraciones de 100, 300 y 500 ppm, respectivamente (Raigond *et al.*, 2017).

Aunque se ha demostrado que la aplicación de NPs ZnO afecta la fisiología y bioquímica de las plantas, todavía hay debates generalizados y ambigüedades sobre los efectos que pueden causar en el metabolismo secundario de la planta (Marslin *et al.*, 2017). Principalmente, el efecto de las NPs en los compuestos fenólicos, ya que estas moléculas desempeñan funciones importantes en el rendimiento y la adaptación de la planta, en respuesta a tipos de estrés bióticos y abióticos (Michalak, 2006).

Por lo tanto, es una prioridad comprender el funcionamiento integral del metabolismo secundario de la planta, en respuesta a la aplicación de NPs como un posible generador de estrés oxidativo. Para mitigar los efectos del estrés oxidativo generados por la aplicación de NPs ZnO, las plantas activan los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para eliminar el exceso de ERO. Uno de los mecanismos más importantes es la activación del metabolismo secundario, y la síntesis de compuestos fenólicos es crucial (Sheteiwiy *et al.*, 2016), ya que desempeñan un papel importante en la desintoxicación de ERO y su concentración puede variar significativamente (Mahendra *et al.*, 2008) debido a que actúan como donadores de electrones a modo de mecanismos de detoxificación en las estructuras de los orgánulos (Mittler, 2017).

Durante el estrés causado por los metales pesados, los compuestos fenólicos actúan como quelantes metálicos y, por otro lado, pueden eliminar directamente las especies moleculares del oxígeno activo, principalmente debido a sus propiedades redox, que pueden desempeñar un papel importante en la absorción y neutralización de los radicales libres, ayudando a controlar los niveles del oxígeno singlete y triplete o la descomposición de los peróxidos (Bhumi *et al.*, 2014).

Por lo tanto, el aumento en la actividad antioxidante de las plantas expuestas a NPs, se debe principalmente al aumento en los compuestos fenólicos, que son eficaces eliminadores de ERO y también son capaces de inhibir las enzimas que producen radicales libres (Doroteo *et al.*, 2013) esto explica la acumulación máxima de fenoles, flavonoides y taninos en las radículas expuestas a la concentración más alta (500 ppm) de NPs ZnO. En base a los resultados anteriores, nuestro estudio es pionero en la evaluación de la fitotoxicidad de las NPs ZnO en *Capsicum annuum* L. y sirve como guía para medir los efectos sobre el crecimiento temprano de las plántulas.

3.5 Conclusiones

Este estudio reveló el efecto de las NPs ZnO a diferentes concentraciones sobre la germinación, el vigor y el crecimiento temprano de las plántulas de *Capsicum annuum* L. Todos los tratamientos con concentraciones de NPs ZnO (100, 200 y 500 ppm) inhibieron significativamente el desarrollo de la radícula debido a un efecto fitotóxico y aumentaron la acumulación de compuestos fenólicos y la actividad

antioxidante en la radícula. Los cambios inducidos por las NPs ZnO en la fisiología y bioquímica de las plantas pueden generar la producción de metabolitos secundarios deseables. Sin embargo, es necesario continuar con estudios que evalúen los efectos de las NPs ZnO para comprender los cambios específicos que causan en el desarrollo de las plántulas.

3.6 Referencias

- Afrayeem, S. M., & Chaurasia, A. K. 2017. Effect of zinc oxide nanoparticles on seed germination and seed vigour in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Pharmacol. Phytochem*, 6, 1564-1566.
- Agarwal, H., Kumar, S. V., & Rajeshkumar, S. 2017. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles an eco friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 406-413.
- Ali, S., Shahbaz, M., Shahzad, A. N., Khan, H. A. A., Anees, M., Haider, M. S., & Fatima, A. 2015. Impact of copper toxicity on stone-head cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) in hydroponics. *PeerJ*, 3, e11119.
- Anusuya, S., & Banu, K. N. 2016. Silver-chitosan nanoparticles induced biochemical variations of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 39-44.
- Awasthi, A., Bansal, S., Jangir, L. K., Awasthi, G., Awasthi, K. K., & Awasthi, K. 2017. Effect of ZnO nanoparticles on germination of *Triticum aestivum* seeds. In *Macromolecular Symposia* 376(1), 1700043.
- Bhumi, G., Raju, R. Y., & Savithamma, N. 2014. Screening of zinc oxide nanoparticles for cell proliferation synthesized through *Adhatoda vasica* nees. *Int. J. Drug Dev. & Res*, 6(2), 97-104.
- Burman, U., Saini, M., & Kumar, P. 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(4), 605-612.
- Comotto, M., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Caratto, V., Ferretti, M., & Perego, P. 2014. Influence of TiO₂ nanoparticles on growth and phenolic compounds

- production in photosynthetic microorganisms. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Corral-Diaz, B., Peralta-Videa, J. R., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Morales, M. I., Osuna-Avila, P., & Gardea-Torresdey, J. L. 2014. Cerium oxide nanoparticles alter the antioxidant capacity but do not impact tuber ionome in *Raphanus sativus* (L). *Plant physiology and biochemistry*, 84, 277-285.
- Doroteo, V. H., Díaz, C., Terry, C., & Rojas, R. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activity in vitro of 6 Peruvian plants. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 79, 13-20.
- Ebbs, S. D., Bradfield, S. J., Kumar, P., White, J. C., Musante, C., & Ma, X. 2016. Accumulation of zinc, copper, or cerium in carrot (*Daucus carota*) exposed to metal oxide nanoparticles and metal ions. *Environmental Science: Nano*, 3(1), 114-126.
- El-Kereti, M., A El-feky, S., S Khater, M., A Osman, Y., & A El-sherbini, E. S. 2013. ZnO nanofertilizer and He Ne laser irradiation for promoting growth and yield of sweet basil plant. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 5(3), 169-181.
- El-Temsah, Y. S., & Joner, E. J. 2012. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental toxicology*, 27(1), 42-49.
- Franklin, G., Conceição, L. F., Kombrink, E., & Dias, A. C. 2009. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry*, 70(1), 60-68.
- Ghiassi-Tarzi, B. G., Gharachorloo, M., Baharinia, M., & Mortazavi, S. A. 2012. The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 1137.
- Ghorbanpour, M. 2015. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(3), 249-256.
- Gokak, I. B., & Taranath, T. C. 2015. Seed germination and growth responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. exposed to Zinc and Zinc nanoparticles. *International Journal of Environmental Sciences*, 5(4), 840.
- Hajra, A., & Mondal, N. K. 2017. Effects of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germination, biochemical and morphoanatomical attributes of *Cicer arietinum* L. *Energy, Ecology and Environment*, 2(4), 277-288.

- Hatami, M., Ghorbanpour, M., & Salehiarjomand, H. 2014. Nano-anatase TiO₂ modulates the germination behavior and seedling vigourity of some commercially important medicinal and aromatic plants. *Journal of Environment Biological*, 8(22), 53-59.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. "International Rules for Seed Testing." 243 p. By Michael Muschick, Z€urichstrasse 50 P.O. Box 308 8303 Bassersdorf CH, Switzerland.
- Javed, R., Mohamed, A., Yücesan, B., Gürel, E., Kausar, R., & Zia, M. 2017. CuO nanoparticles significantly influence *in vitro* culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131(3), 611-620.
- Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y. C., Braam, J., & Alvarez, P. J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 29(3), 669-675.
- Lee, S., Kim, S., Kim, S., & Lee, I. 2013. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 848-854.
- Lin, D., & Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243-250.
- Lin, D., & Xing, B. 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5580-5585.
- Lira Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., Vera Reyes, I., & de los Santos Villarreal, G. 2018. Agronanotecnología: una nueva herramienta para la agricultura moderna. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 50(2), 395-411.
- Liu, R., & Lal, R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*, 514, 131-139.
- López-Contreras, J. J., Zavala-Garcia, F., Urias-Orona, V., Martinez-Avila, G. C. G., Rojas, R., & Guillermo, N. M. 2015. Chromatic, phenolic and antioxidant properties of Sorghum bicolor genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 366-370.
- Ma, Y., Kuang, L., He, X., Bai, W., Ding, Y., Zhang, Z., & Chai, Z. 2010. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere*, 78(3), 273-279.

- Mahendra, S., Zhu, H., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. 2008. Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environmental Science & Technology*, 42(24), 9424-9430.
- Marichali, A., Dallali, S., Ouerghemmi, S., Sebei, H., & Hosni, K. 2014. Germination, morpho-physiological and biochemical responses of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to zinc excess. *Industrial Crops and Products*, 55, 248-257.
- Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. 2017. Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in Plant Science*, 8, 832.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4).
- Mittler, R. 2017. ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
- Moran, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abian, J., & Becana, M. 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 861-870.
- Narendhran, S., Rajiv, P., & Sivaraj, R. 2016. Toxicity of ZnO nanoparticles on germinating *Sesamum indicum* (Co-1) and their antibacterial activity. *Bulletin of Materials Science*, 39(2), 415-421.
- Parry, A. D., Tiller, S. A., & Edwards, R. 1994. The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant physiology*, 106(1), 195-202.
- Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. 2018. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 120-127.
- Raigond, P., Raigond, B., Kaundal, B., Singh, B., Joshi, A., & Dutt, S. 2017. Effect of zinc nanoparticles on antioxidative system of potato plants. *Journal of Environmental Biology*, 38(3), 435.
- Rajeshwari, A., Suresh, S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. 2016. Toxicity evaluation of gold nanoparticles using an *Allium cepa* bioassay. *RSC Advances*, 6(29), 24000-24009.
- Ramakrishna, R., & Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.

- Rameshraddy, G. J., Pavithra, G. J., Mahesh, S., Geetha, K. N., & Shankar, A. G. 2017. Seed priming and foliar spray with nano zinc improves stress adaptability and seed zinc content without compromising seed yield in ragi (*Finger millet*). *Int. J. Pure Appl. Biosci*, 5, 251-258.
- Raskar, S. V., & Laware, S. L. 2014. Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2), 467-73.
- Salah, S. M., Yajing, G., Dongdong, C., Jie, L., Aamir, N., Qijuan, H., & Jin, H. 2015. Seed priming with polyethylene glycol regulating the physiological and molecular mechanism in rice (*Oryza sativa* L.) under nano-ZnO stress. *Scientific Reports*, 5, 14278.
- Scalbert, A., & Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Sewelam, N., Kazan, K., & Schenk, P. M. 2016. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, 7, 187.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K., & Arora, S. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(8), 2225-2233.
- Sheteiwy, M. S., Fu, Y., Hu, Q., Nawaz, A., Guan, Y., Li, Z., & Hu, J. 2016. Seed priming with polyethylene glycol induces antioxidative defense and metabolic regulation of rice under nano-ZnO stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19989-20002.
- Singh, A., Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., Yadav, V., & Singh, S. C. 2016. Green synthesis of nano zinc oxide and evaluation of its impact on germination and metabolic activity of *Solanum lycopersicum*. *Journal of biotechnology*, 233, 84-94.
- Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., & Colbeck, I. 2016. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 85(2), 245-257.
- Takahama, U., & Oniki, T. 2000. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research*, 113(3), 301-309.
- Van Breusegem, F., & Dat, J. F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141(2), 384-390.

- Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M., Wouterlood, M., Van Aelst, A. C., & Borstlap, A. C. 2003. Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany*, 91(6), 729-737.
- Večeřová, K., Večeřa, Z., Dočekal, B., Oravec, M., Pompeiano, A., Tříška, J., & Urban, O. 2016. Changes of primary and secondary metabolites in barley plants exposed to CdO nanoparticles. *Environmental Pollution*, 218, 207-218.
- Wang, B., Feng, W.Y., Wang, T.C., Jia, G., Wang, M., Shi, J.W., Zhang, F., Zhao, Y.L., Chai, Z.F. 2006. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol. Lett*, 161, 115–123.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. 2016. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in Plant Science*, 21(8), 699-712.
- Xiang, L., Zhao, H. M., Li, Y. W., Huang, X. P., Wu, X. L., Zhai, T., & Mo, C. H. 2015. Effects of the size and morphology of zinc oxide nanoparticles on the germination of *Chinese cabbage* seeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10452-10462.
- Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., Mao, C., & Wang, L. 2015. Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(12), 15100-15109.
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 7, 535.
- Zhang, R., Zhang, H., Tu, C., Hu, X., Li, L., Luo, Y., & Christie, P. 2015. Phytotoxicity of ZnO nanoparticles and the released Zn (II) ion to corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) during germination. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 11109-11117.

CAPÍTULO 4: LA APLICACIÓN FOLIAR DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y SULFATO DE ZINC AUMENTA EL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CHILE HABANERO

García-López, J.I.¹; Niño-Medina, G.¹; Olivares-Sáenz, E.¹; Lira-Saldivar, R.H.²; Barriga-Castro, E.D.²; Vázquez-Alvarado, R.¹; Rodríguez-Salinas, P.A.¹; Zavala-García, F.¹. Foliar Application of Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate Boosts the Content of Bioactive Compounds in Habanero Peppers. *Plants* 2019, **8, 254. Doi: doi.org/10.3390/plants8080254**

(Publicado en *Plants Journal* el 30 de Julio 2019, Apéndice 3)

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Química y Bioquímica, Francisco Villa S/N, Col. Ex-Hacienda el Canadá, C.P. 66050 General Escobedo, Nuevo León, México.

²Centro de investigación en Química Aplicada, Departamento de Agroplasticultura, Enrique Reyna H. No. 140, San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coahuila.

* Correspondencia: guillermo.ninomd@uanl.edu.mx; francisco.zavalag@uanl.mx

4.1 Resumen

Es este estudio, se evaluaron las respuestas fisiológicas de las plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) a las aplicaciones foliares de sulfato de zinc y nanofertilizante de zinc en ensayos de invernadero. Particularmente, se observó el efecto de los suplementos a base de zinc sobre la calidad del fruto del chile habanero. Las plantas de chile habanero se cultivaron hasta la madurez, y durante las principales etapas del desarrollo fenológico, se trataron con aplicaciones foliares de Zn a concentraciones de 1000 y 2000 mg L⁻¹ en forma de sulfato de zinc (ZnSO₄) y nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO). No se suministró Zn adicional a las

plantas de tratamiento de control. Las NPs ZnO a una concentración de 1000 mg L⁻¹ afectaron positivamente la altura de la planta, el diámetro del tallo y el contenido de clorofila, y aumentaron el rendimiento del fruto y la acumulación de biomasa en comparación con los tratamientos control y ZnSO₄. Por el contrario, las NPs ZnO a 2000 mg L⁻¹ afectaron negativamente el crecimiento de las plantas pero aumentaron significativamente la calidad de los frutos, el contenido de capsaicina en un 19.3%, la dihidrocapsaicina en un 10.9% y las Unidades de Picor Scoville (SHU²) en un 16.4%. Además, a 2000 mg L⁻¹ aumentó el contenido de fenoles totales y flavonoides totales (solubles + ligados) en los frutos (14.50% y 26.9%, respectivamente), lo que resultó en una mayor capacidad antioxidante en ABTS (2,2' azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y FRAP (poder antioxidante reductor férrico) (15.4%, 31.8% y 20.5%, respectivamente). Estos resultados indican que la aplicación de NPs ZnO podría emplearse en la producción de chile habanero para mejorar el rendimiento, la calidad y las propiedades nutraceuticas de los frutos.

4.2 introducción

La adición de fertilizantes para complementar la fertilidad natural del suelo es esencial para la producción moderna de cultivos, y el manejo preciso de nutrientes es indispensable para una producción agrícola sostenible (Davarpanah *et al.*, 2016). El zinc (Zn) desempeña un papel importante en las funciones de la planta, modifica los efectos de las auxinas mediante la regulación de la síntesis de triptófano y actúa

como cofactor en las enzimas redox como la superóxido dismutasa y las deshidrogenasas (Narendhran *et al.*, 2016). Los microelementos desempeñan papeles importantes en el desarrollo de las plantas, el rendimiento y la calidad de los frutos (Singh y Ram, 1983; Khan *et al.*, 1993). El zinc es un micronutriente esencial para humanos, animales y plantas. Las plantas generalmente absorben Zn como un catión divalente (Zn^{++}).

El zinc se requiere en la biosíntesis de proteínas y el metabolismo de los carbohidratos, y juega un papel importante en la expresión génica relacionada con el estrés ambiental (Cakmak, 2000; Sadeghzadeh y Rengel, 2011). Aunque las plantas requieren Zn para un metabolismo óptimo, la eficiencia de este microelemento depende de su absorción y translocación (Rengel, 2001). En las prácticas agrícolas tradicionales, se emplea sulfato de Zn ($ZnSO_4$) o quelato de EDTA-Zn para su aplicación en las hojas y el suelo, sin embargo, la eficiencia es baja (Fageria *et al.*, 2002). Por lo tanto, la absorción de Zn a través de las hojas parece estar determinada por la fuente de los micronutrientes.

Por ejemplo, en un estudio realizado por Doolette *et al.* (2018) en plantas de *Triticum aestivum* cv Shield, al comparar la fertilización foliar con $ZnSO_4$ y ZnEDTA a una concentración de 1000 mg L^{-1} , hubo una proporción significativamente mayor de Zn en las hojas tratadas con $ZnSO_4$ en comparación con las hojas tratadas con ZnEDTA. La aplicación foliar de Zn es una forma efectiva de aumentar la absorción de Zn en las plantas, sin embargo, el desarrollo de fertilizantes foliares a base de Zn

se ve comprometido por la falta de conocimiento, el desarrollo de nuevos materiales, la movilidad y la especiación de Zn dentro de la planta (Doolette *et al.*, 2018; Read *et al.*, 2019). En México, el chile habanero se consume principalmente en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco, con una demanda creciente en los mercados mexicanos e internacionales. Sin embargo, los rendimientos actuales de los cultivos no satisfacen la demanda local, principalmente debido a la tecnología limitada para su producción y el suministro adecuado de fertilizantes a través del sistema de riego (Tucuch *et al.*, 2012). Por lo tanto, se necesita un método de fertilización optimizado que aumente el rendimiento del cultivo y reduzca la contaminación mediante el uso de fertilizantes más eficientes.

El uso de fertilizantes foliares a base de Zn, durante el desarrollo de los cultivos puede ser una forma efectiva de incrementar la asimilación de Zn y aumentar el rendimiento, sin embargo, las sales solubles de Zn pueden dañar la hoja y su costo es muy elevado (Read *et al.*, 2019). Por el contrario, las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) se consideran un material bioseguro para especies biológicas, ya que se ha demostrado que su eficiencia promueve la germinación de semillas y el crecimiento de plantas, así como la supresión de enfermedades y la protección de las plantas por su actividad antimicrobiana (Singh *et al.*, 2017). La concentración de Zn en la solución del suelo es muy baja y se presenta en forma de varios tipos de sales que incluyen esfalerita ($(\text{ZnFe})\text{S}$) y smithsonita (ZnCO_3), sin embargo, la absorción de este elemento por las plantas está determinada por la concentración de carbonatos (CaCO_3) y el pH del suelo, que son las principales causas que limitan la

disponibilidad de este micronutriente (Mengel y Kirkby, 1987). Como consecuencia, existe un creciente interés en la fertilización foliar para el manejo sostenible de los cultivos. La fertilización foliar resuelve la disponibilidad limitada de nutrientes al minimizar las pérdidas de fertilizantes aplicados al suelo y eso permite la entrega de nutrientes a los órganos de la planta durante las etapas críticas de crecimiento (Fernández y Brown, 2013).

La nanotecnología, con el uso de nanopartículas (NPs) proporciona enfoques novedosos para la nutrición de las plantas (Liu y Lal, 2015). Los fertilizantes a escala nanométrica (1-100 nm) aumentan en gran medida los puntos de impacto debido a su tamaño reducido, que a su vez podría mejorar la interacción y la absorción de micronutrientes en la fertilización de cultivos (Singh *et al.*, 2017). Las aplicaciones foliares de nanofertilizantes han demostrado ser efectivas debido a que suministran nutrientes a las plantas de forma gradual y controlada en comparación con la fertilización convencional (Prasad *et al.*, 2012; Kah *et al.*, 2018).

Además, la aplicación de nanofertilizantes requiere cantidades más pequeñas que los fertilizantes convencionales (Davarpanah *et al.*, 2016). Un estudio realizado por Rossi *et al.* (2018) demostró que la aplicación foliar de NPs ZnO influyó positivamente en el crecimiento y la fisiología de las plantas de café (*Coffea arabica* L.), incluso más que la aplicación de sales de Zn (ZnSO_4), debido a una mayor penetración de la hoja. La investigación con árboles de granada (*Punica granatum* cv. Ardestani) demostró que la fertilización foliar con cantidades relativamente bajas

de nano fertilizantes de Zn y B modificaron el rendimiento y la calidad de la fruta, y además aumentaron los azúcares y el índice de madurez (Davaranah *et al.*, 2016). Nuestro grupo de investigación, también ha observado efectos positivos de las NPs ZnO en la germinación de *Capsicum chinense*, que a su vez, afectaron positivamente variables fisiológicas (germinación de semillas, vigor de plántulas y acumulación de biomasa) y propiedades nutraceuticas (fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados y DPPH capacidad antioxidante) (García-López *et al.*, 2018).

Los efectos de las NPs ZnO en las plantas son el resultado de cambios en las características físicas, químicas y biológicas de los materiales aplicados como nanofertilizantes, así como de sus propiedades catalíticas (Qados, 2015). En consecuencia, estos cambios afectan las actividades químicas y biológicas que podrían inducir el estrés oxidativo, la toxicidad en las plantas y estimular los sistemas antioxidantes (García-Gómez *et al.*, 2017). Un estudio reciente concluyó que la nanotoxicidad depende de la composición, la concentración de las NPs y las especies evaluadas (Nhan *et al.*, 2015). Aunque se ha informado el efecto de las NPs ZnO en cultivos como la cebolla (*Allium cepa* L.), el guisante verde (*Pisum sativum* L.) y la espinaca (*Spinacia oleracea*) (Laware y Raskar, 2014; Mukherjee *et al.*, 2016; Singh y Kumar, 2016) no se han publicado estudios que describan la interacción de las NPs ZnO y ZnSO₄ en el cultivo de chile habanero.

Por lo tanto, esta investigación comparó las respuestas de crecimiento de las plantas de chile habanero a las aplicaciones foliares de ZnSO₄ y NPs ZnO, analizando la

calidad y acumulación de compuestos bioactivos de los frutos de chile obtenidos de plantas tratadas con ZnSO_4 y NPs ZnO para comprender su efecto sobre la fisiología y bioquímica de las plantas y frutos de chile habanero.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Material vegetal

La variedad *Capsicum chinense* utilizada fue Chichen Itza (Seminis, St. Louis, MO, EUA, USA). Es una planta vigorosa y de maduración temprana que puede cosecharse hasta dos semanas antes que otras variedades. Los frutos tienen tres lóbulos y un atractivo color naranja y generalmente son muy picantes con 10,500 unidades de SHU cuando están frescos y hasta 200,000 SHU al estar secos.

4.3.2 Características de las NPs ZnO utilizados en este experimento

La caracterización morfológica y estructural de las NPs ZnO utilizadas en este estudio ha sido reportada previamente por García-López *et al.* (2018). Específicamente, la mayoría de las partículas (75%) tenían diámetros de 12 a 24 nm, y el 30% mostraba tamaños mayores que 12 nm y menores que 20 nm.

4.3.3 Preparación de las suspensiones

Las suspensiones de ZnSO_4 y NPs ZnO se prepararon justo antes de la exposición en agua desionizada (DI) y se homogeneizaron con un sonicador de sonda (Qsonica, CT, USA) durante 30 min a 120 voltios, 3 amperios y 50 a 60 GHz. Posteriormente, el pH de cada suspensión se ajustó a 6.5-6.7 con HCl y NaOH 0.1 N antes de la exposición a la planta (Raliya y Tarafdar, 2013). Los tratamientos aplicados fueron: control absoluto sin Zn, 1000 mg L^{-1} y 2000 mg L^{-1} con ZnSO_4 , 1000 mg L^{-1} y 2000 mg L^{-1} con NPs ZnO , con cinco repeticiones para cada tratamiento. La unidad experimental fue una planta por maceta. Las concentraciones utilizadas se seleccionaron de estudios previos realizados por Torabian *et al.* (2016) y Kisan *et al.* (2015) Las conductividades eléctricas (CE) de las suspensiones con ZnSO_4 fueron 0.97 y 1.64 mS cm^{-1} para 1000 y 2000 mg L^{-1} , mientras que la CE de las suspensiones con NPs ZnO fueron 0.68 y 1.11 mS cm^{-1} para 1000 y 2000 mg L^{-1} , respectivamente. Las plantas del tratamiento de control se trataron con agua destilada con una CE de 0.37 mS cm^{-1} .

4.3.4 Exposición foliar a Zn

Aproximadamente, se rociaron 0.125 L de las suspensiones de Zn para cubrir el follaje de la planta, dos veces en cada una de las siguientes etapas de desarrollo del cultivo: crecimiento vegetativo (CV) 45-89 días, floración (FL) 90-140 días, desarrollo del fruto (DF) 141-170 días y madurez (M) 171-205 días, para obtener una cantidad

total de 0.8 y 1.6 mg de zinc por planta. Para la aplicación foliar, se usó un rociador manual Hudson RL Flomaster de 1.2 L (Lowell, MI, USA), equipado con una boquilla de latón y una válvula de seguridad. Las condiciones para el crecimiento del cultivo se explican en la siguiente sección. En la Figura 10, se muestran de manera representativa cada una de las etapas fenológicas del cultivo, además de la aplicación foliar de los tratamientos.



Figura 10. Representación esquemática de cada una de las etapas vegetativas del cultivo, además, se presenta una imagen representativa de la forma en que se aplicaron los tratamientos.

4.3.5 Crecimiento de plantas de chile habanero y condiciones de invernadero

Las plantas de chile habanero se establecieron en un invernadero de tipo israelí equipado con ventanas laterales y cenitales semiautomáticas, cubiertas con polietileno. El experimento se llevó a cabo durante 208 días después del trasplante. La temperatura promedio fue de 22.1 °C a una humedad relativa del 79%. La densidad de siembra fue de 2.4 plantas por m². Como medio de crecimiento, se utilizó pumicita en contenedores de plástico blanco de 19 L.

En este estudio, se empleó un sistema de riego automatizado por goteo, con ocho riegos al día que proporcionó aproximadamente 3.2 L de agua por planta. La solución nutritiva se basó en Steiner (1961) a un pH de 6.5. Durante el crecimiento vegetativo, la concentración fue del 25% y aumentó al 50% durante la floración y el desarrollo del fruto (López-Gómez *et al.*, 2017). Cada maceta recibió cantidades iguales de solución nutritiva, la cual no contenía Zn.

4.3.6 Variables de rendimiento y contenido relativo de clorofila

Durante el ciclo de vida de la planta, se midieron parámetros fisiológicos y agronómicos como la altura de la planta, el diámetro del tallo y el contenido de clorofila a los 45, 90, 145 y 201 días. Estas fechas coinciden con el crecimiento vegetativo (CV), la floración (FL), el desarrollo del fruto (DF) y la madurez (M), respectivamente. El contenido relativo de clorofila se determinó en plantas frescas, con un medidor portátil de clorofila (SPAD-502, Minolta, Osaka, Japón). Los datos informados son promedios de tres mediciones por hoja para cada unidad experimental (Zuverza-Mena *et al.*, 2015).

Al final del cultivo, se cuantificó el número de frutos cosechados por planta, el peso promedio de los frutos (g), el rendimiento por planta (peso total de las frutas g) y el peso fresco y seco de la biomasa aérea (g). Este conjunto de datos se registró a los 208 días para evaluar el crecimiento y el rendimiento de las plantas de chile habanero. El peso seco de la biomasa aérea (g) se obtuvo después del secado en

una estufa Lab-Line (Modelo 3478M, Iztapalapa, México) a una temperatura constante de 70 °C durante un período de 72 h.

4.4 Preparación para el análisis de los frutos de chile habanero

En este estudio, los frutos se cosecharon 208 días después de la siembra, en la etapa completamente madura (color naranja). Posteriormente, se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% y se secaron en un lugar fresco y ventilado (Simonovska *et al.*, 2016). Después del secado, se determinó el efecto del ZnSO₄ y NPs ZnO sobre la calidad del fruto, evaluando 10 frutos uniformes sin defectos (daño físico o patológico) seleccionados de cada una de las cinco repeticiones por tratamiento (Elibox, 2015). Para ello, se tomaron muestras de un total de 50 frutos por tratamiento: de las cuales se usaron 25 frutos para los análisis físicos y químicos, y los 25 frutos restantes fueron para análisis funcionales (Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017).

4.4.1 Evaluaciones fisicoquímicas de los frutos

Las evaluaciones cromáticas en la corteza del fruto se realizaron con un colorímetro Konica Minolta CR-10 (Tokio, Japón). Los parámetros cromáticos se obtuvieron utilizando los sistemas de color CIELAB (L^* , a^* , b^*) y CIELCH (L^* , C^* , h^*) de acuerdo con la Comisión Internacional de Comercio (CIE, 2004). L^* define luminosidad (0 negro, 100 blanco), a^* indica rojo (positivo a^*) o verde (negativo a^*), b^* indica amarillo

(positivo b^*) o azul (negativo b^*), C^* (cromo), nivel de saturación de h) y h (ángulo de tono: 0° = rojo, 90° = amarillo, 180° = verde, 270° = azul). La visualización en color se obtuvo utilizando el software en línea ColorHexa (2019) usando los valores L^* , a^* y b^* .

La firmeza y la fuerza de corte en los frutos se evaluaron con un medidor de fuerza Ametek Chatillon DFS II adaptado a un sistema de rotación manual (West, Sussex, Reino Unido). Las frutas se deformaron a una distancia total de 2 mm con una placa de compresión de 30 mm; la fuerza máxima requerida se registró en Newton (N). Después de las evaluaciones físicas, las frutas se almacenaron a -20°C hasta que se realizaron las evaluaciones químicas. Los sólidos solubles totales ($^\circ\text{Brix}$) se determinaron directamente del jugo de cada fruto con un refractómetro (Atago MASTER-M, Tokio, Japón) con una escala de 0 a 33%.

Para la determinación de la acidez titulable (TA) y el pH, las frutas se cortaron en rodajas con un cuchillo y se colocaron dentro de una bolsa de polietileno para producir una mezcla homogénea; luego se tomaron 5 g de muestra (pericarpio y placenta sin semilla), se agregaron 25 mL de agua y la mezcla se procesó durante 40 s en un mezclador Oster (M4655-813/465-42, Sunbeam, Cd de México, México). El extracto se filtró a través de tela de organza. El pH se midió utilizando un potenciómetro de mesa (medidor de pH/ORP HI 2221, Cd de México, México). La acidez valorable (TA) se determinó mediante el método 942.15 de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2000), con 0.1 M NaOH a pH 8.2 usando

fenolftaleína como indicador. La acidez valorable se informó en % de ácido cítrico en peso fresco.

4.4.2 Preparación de muestras para capsaicinoides, fenólicos y análisis de capacidad antioxidante

Los frutos de chile habanero fueron cortados con un cuchillo, y las semillas fueron removidas para determinar compuestos bioactivos y funcionales. Posteriormente, los frutos se colocaron en una bolsa de polietileno para obtener una mezcla homogénea y las muestras se almacenaron en un ultracongelador (3003 Ultrafreezer Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a -80 °C hasta el análisis.

4.4.3 Extracción de capsaicinoides

La extracción y cuantificación de capsaicinoides se basó en el método establecido por Ryu *et al.* (2017), para ello se pesaron 5 g de muestra fresca de chile habanero (pericarpio y placenta sin semilla) y se agregaron 25 mL de acetona. La mezcla se procesó durante 30 s en un mezclador Oster (M4655-813/465-42, Cd de México, Mexico). El extracto se calentó a 50 °C durante una hora en un horno de laboratorio (ON-12G, Jeio Tech, Corea). Después de este período, las muestras se centrifugaron a 4500 x g durante 5 min, y el sobrenadante se recuperó para el análisis.

4.4.4 Cuantificación de capsaicina y dihidrocapsaicina por HPLC

Para el análisis por HPLC, los extractos con acetona se filtraron con un filtro de jeringa de 0.25 mm con un tamaño de poro de 45 μm , y se inyectaron 10 μL directamente en el sistema (HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity, bomba cuaternaria Agilent 1260 G1311B) equipada con inyector automático y detector DAD (Agilent 1260 G4212B). La columna utilizada fue una columna analítica ZORBAX Eclipse Plus C-18 (100 mm x 3 mm id, 5 μm). La fase móvil isocrática consistió de 100% de acetonitrilo (solvente A) y 1% de ácido acético en agua (solvente B) en una proporción de 40:60 y un caudal de 1 mL min^{-1} a 25 $^{\circ}\text{C}$, con un tiempo de ejecución de 20 min. La absorbancia se midió a 280 nm.

La cuantificación de capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida) y dihidrocapsaicina (8-metil-N-vainillilnonamida) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, EE. UU.) se basó en las curvas de calibración correspondientes a concentraciones de 0 , 80, 160, 240, 320 mg kg^{-1} (Ryu *et al.*, 2017).

4.4.5 Determinación de las unidades de Scoville

El contenido de capsaiconoides (mg kg^{-1}) se transformó a Unidades Scoville de Picor (SHU), con base en lo establecido por Todd *et al.* (1977). Las determinaciones de la pugnecencia en SHU se realizaron multiplicando los contenidos individuales de

capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) por el valor correspondiente a la intensidad del umbral.

$$[(\% \textit{Capsaicina} \times 16.1) + (\% \textit{Dihidrocapsaicina} \times 16.1)] \times 10,000 = SHU^2$$

4.5 Extracción de compuestos fenólicos solubles y ligados

Los extractos solubles se obtuvieron suspendiendo 5 g de muestra de chile fresco (pericarpio y placenta sin semilla) en 50 mL de metanol al 80%. La muestra se purgó con una corriente de argón durante 30 s y se mezcló durante 45 s en un mezclador Oster (M4655-813/465-42, Sunbeam, Cd de México, México). Finalmente, la mezcla se filtró con tejido de organza para separar la materia insoluble del jugo y se colocó en tubos de centrifuga de 15 mL. El extracto se centrifugó a 4500 x g, y el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20 °C hasta el análisis.

Los compuestos fenólicos ligados se extrajeron suspendiendo la materia insoluble restante en 10 mL de 2 mol L⁻¹ NaOH y se purgaron con argón durante 30 s. Luego, la mezcla se agitó a 200 rpm durante 2 h. Después de eso, el pH se ajustó a 2.5 con HCl concentrado y se centrifugó a 4500x g. El sobrenadante se recuperó y se extrajeron los compuestos fenólicos con 10 mL de acetato de etilo dos veces. Los extractos de acetato de etilo se combinaron y se evaporaron a 40 °C con argón. El extracto seco se almacenó a -20 °C y, antes del análisis, se suspendió en 3 mL de metanol al 80%. Los extractos obtenidos de compuestos fenólicos solubles y ligados

se usaron para los ensayos de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante en base a lo establecido por Lopez-Contreras *et al.*, (2015).

4.5.1 Determinación de fenoles totales

Los ensayos de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante se realizaron en un espectrofotómetro Barnstead International Turner SP-830 Plus (Dubuque, IA, USA). Para la determinación del contenido de fenoles, se tomaron 0.2 mL de cada extracto y se agregaron 2.6 mL de agua destilada y 0.2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 5 min, se agregaron 2 mL de Na_2CO_3 al 7% y la solución se agitó durante 30 s, para luego llevar la reacción en oscuridad por 90 min, posteriormente se midió la absorbancia de las muestras a 750 nm. La concentración de fenoles se reportó en miligramos equivalente de ácido gálico por kilogramo de muestra (mgGAE kg^{-1}), calculado a partir de la curva de calibración de ácido gálico de 0 a 200 mg L^{-1} .

4.5.2 Determinación de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides se basó en la reacción del complejo $\text{AlCl}_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$, para esto se tomaron 0.2 mL del extracto y se agregaron 3.5 mL de agua destilada. Luego se agregaron 0.15 mL de NaNO_2 al 5%, 0.15 mL de AlCl_3 al 10% y 1 mL de NaOH 1 M, a intervalos de 5 min cada uno. La reacción se dejó durante 15 min y después se midió la absorbancia a 510 nm. El contenido total de

flavonoides se informó en miligramos de equivalente de catequina por kilogramo de muestra (mgCatE kg^{-1}), calculado a partir de la curva de calibración de catequina de 0 a 200 mg L^{-1} .

4.5.3 Determinación de taninos condensados

El contenido de taninos condensados se determinó mediante la reacción del complejo vanillin- H_2SO_4 . Del extracto, se tomaron 0.25 mL y se agregaron 0.65 mL de vainillina al 1%; después, 0.65 mL de H_2SO_4 al 25% (ambos se disolvieron en metanol). La reacción se llevó a cabo durante 15 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, y finalmente, la absorbancia de las muestras se midió a 500 nm. El contenido de taninos condensados se reportó en miligramos equivalente de catequina por kilogramo de muestra (mgCatE kg^{-1}), calculados a partir de la curva de calibración para catequina de 0 a 200 mg L^{-1} .

4.5.4 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl) se evaluó utilizando una solución de trabajo $60 \text{ } \mu\text{M}$ en metanol al 80%, con una absorbancia ajustada a 0.98 a 517 nm. El ensayo se llevó a cabo mezclando $50 \text{ } \mu\text{L}$ del extracto con 1.5 mL de la solución de trabajo DPPH, la reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad y se determinó la absorbancia.

La capacidad antioxidante de ABTS (ácido 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfónico) se llevó a cabo utilizando una solución de trabajo obtenida mezclando 1 mL de ABTS al 7.4 mM y 1 mL de $K_2S_2O_8$, permitiéndoles reaccionar durante 12 h en oscuridad. Después, la absorbancia de la solución de trabajo se ajustó a 0.97 a 734 nm diluyendo con metanol. El ensayo ABTS se realizó mezclando 50 μ L del extracto con 1.5 mL de solución de trabajo ABTS; la reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad y se midió la absorbancia.

La capacidad antioxidante de FRAP (poder antioxidante reductor férrico) se determinó utilizando una solución de trabajo preparando una mezcla 300 mM $\cdot C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, en HCl 40 mM) y 20 mM de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en proporción 10:1:1 (V:V:V). El ensayo FRAP se preparó mezclando 50 μ L del extracto con 1.5 mL de solución de trabajo FRAP, la reacción se dejó durante 30 min en la oscuridad a 37 °C y la absorbancia de las muestras se tomó a 593 nm.

La capacidad antioxidante para los ensayos DPPH, ABTS y FRAP se reportaron en milimoles de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico ácido) equivalente por kilogramo de muestra ($mmolTE\ kg^{-1}$), en base a la curva de calibración con Trolox en concentraciones de 0 a 500 $mmol\ L^{-1}$

4.5.5 Diseño experimental y análisis estadístico

El cultivo se estableció utilizando un diseño experimental completamente al azar, con cinco tratamientos y cinco unidades experimentales por tratamiento; la unidad experimental fue de una planta por maceta. Para la información obtenida de las variables evaluadas durante el desarrollo del cultivo (altura de planta, diámetro de tallo y clorofila), se utilizó un análisis con arreglo factorial 5x4 (AxB) considerando al factor A las concentraciones con ZnSO₄ y NPs ZnO (control, 1000 y 2000 mg L⁻¹) y como factor B las etapas fenológicas del cultivo (crecimiento vegetativo, floración, desarrollo del fruto y madurez).

Para las variables de rendimiento y los análisis fisicoquímicos se utilizó un diseño completamente aleatorio con cinco unidades experimentales por tratamiento, únicamente los análisis funcionales de capsaicinoides, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante tuvieron tres unidades experimentales. Los resultados se informaron como media ± desviación estándar, las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras se analizaron con un ANOVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4.6 Resultados y discusión

4.6.1 Crecimiento de las plantas de chile habanero

Las variables de comportamiento agronómico fueron evaluadas durante el desarrollo fenológico de las plantas. El crecimiento de las plantas aumentó significativamente desde la etapa de floración con la aplicación foliar de NPs ZnO a una concentración de 1000 mg L^{-1} , pero no se encontraron diferencias significativas entre ZnSO_4 y el control (Figura 11a). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los mayores incrementos en la altura de la planta se obtuvieron con la aplicación de NPs ZnO a 1000 mg L^{-1} . Este comportamiento mejoró desde las etapas FL, DF y M, con incrementos de 10.6%, 8.6% y 13.4% respectivamente, en comparación con el tratamiento control. Mientras que al compararlas con las plantas tratadas con ZnSO_4 , no se observaron diferencias significativas, pero se obtuvieron incrementos de 5.8%, 4.2% y 3.6%, respectivamente. Por otro lado, la aplicación de NPs ZnO y ZnSO_4 a 2000 mg L^{-1} afectó negativamente la altura de la planta. Las reducciones con NPs ZnO fueron de 16.7%, 4.7% y 6.2%, mientras que el tratamiento con ZnSO_4 redujo la altura de la planta en 5.1%, 3.0% y 2.9%, en comparación con el tratamiento de control.

El comportamiento en el desarrollo del diámetro del tallo (Figura 11b) fue similar al de la altura de la planta, a partir de las etapas FL, FG y M, las NPs ZnO a 1000 mg L^{-1} promovieron el crecimiento del tallo. Cabe señalar que los incrementos obtenidos superaron en 8.3%, 10.7% y 27.9% al tratamiento control, en cambio, al compararlas

con las plantas tratadas con ZnSO_4 los incrementos fueron del 2.1%, 6.5% y 18.7%, respectivamente. Sin embargo, a 2000 mg L^{-1} de NPs ZnO y ZnSO_4 se observan disminuciones a partir de la etapa DF hasta M; en el tratamiento con NPs ZnO a 2000 mg L^{-1} las reducciones fueron del 10.5% y 11.6%, mientras que el ZnSO_4 redujó en 4.1% y 1.5% en comparación con las plantas del tratamiento control.

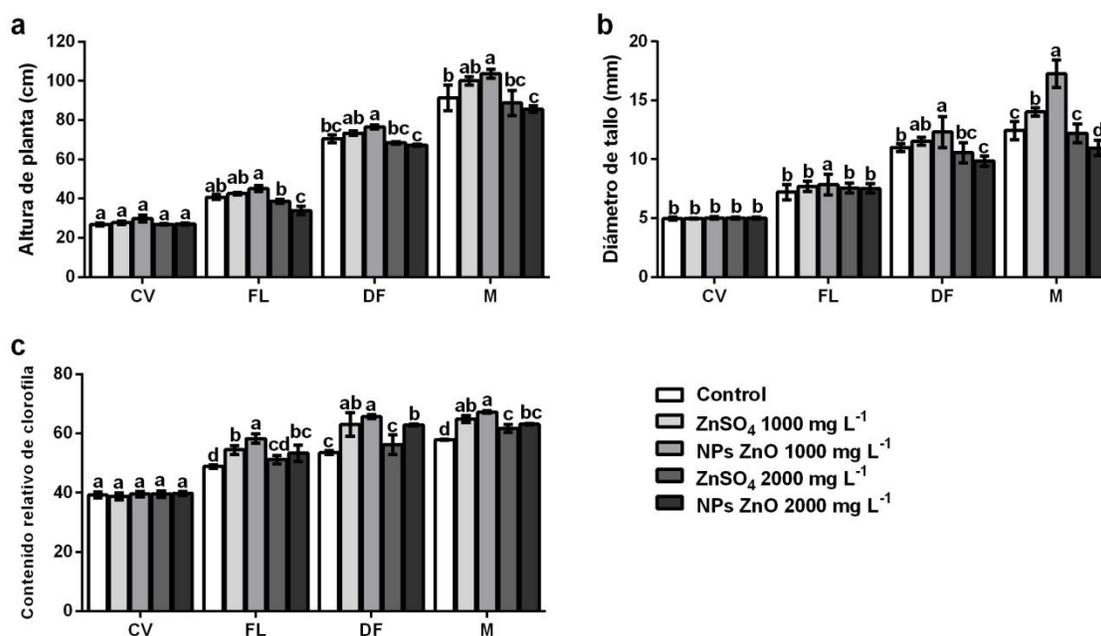


Figura 11. Efecto de la aplicación foliar de ZnSO_4 y NPs ZnO en parámetros agronómicos (altura de planta y diámetro de tallo), y bioquímicos (clorofila SPAD) en diferentes estados fenológicos de las plantas de *C. chinense*. (CV) crecimiento vegetativo, (FL) floración, (DF) desarrollo del fruto y (M) madurez. Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias ($n = 5$), las barras representan la desviación estándar de la media; letras diferentes significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) y representan las diferencias entre tratamientos, en cada etapa fenológica.

Los resultados de esta investigación sugieren que la aplicación foliar con NPs ZnO a 1000 mg L^{-1} tuvo un mayor impacto en el crecimiento y la fisiología de las plantas que las sales convencionales de Zn (ZnSO_4), lo que probablemente se debió a una mayor

capacidad para ser absorbidas por la hoja. Rossi *et al.* (2018) compararon la fertilización foliar de NPs ZnO y ZnSO₄ en plantas de *Coffea arabica* L. a concentraciones de 10 mg L⁻¹, y concluyeron que las hojas tratadas con NPs ZnO contenían concentraciones más altas de Zn (1267.1 ± 367.2 mg kg⁻¹ DW) en comparación con las plantas tratadas con ZnSO₄ (344.1 ± 106.2 mg kg⁻¹ DW), mientras que las plantas del control tenían solo una pequeña cantidad de Zn en sus hojas (53.6 ± 18.9 mg kg⁻¹ DW). Esta acumulación resultó en efectos positivos sobre el desarrollo de hojas y raíces en un 95% y 37% respectivamente, en comparación con el tratamiento control. En conjunto, estos resultados indican que la asimilación de Zn es más eficiente cuando se usan partículas de tamaño nanométrico. Hallazgos similares fueron encontrados por Pavani *et al.* (2014), quienes demostraron un mayor crecimiento en las plántulas tratadas con NPs ZnO, mientras que las plántulas cultivadas en ZnSO₄ crecieron más lentamente. Los nanofertilizantes foliares pueden ser más efectivos que los fertilizantes foliares convencionales, ya que su liberación puede ser lenta y gradual (De Rosa *et al.*, 2010), pero aún no se especifica si este efecto se debe a la absorción de la nanopartícula o a la disolución de sus productos (Wang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018).

Sin embargo, a concentraciones de 2000 mg L⁻¹ se afectó el desarrollo de la planta, posiblemente debido a un efecto fitotóxico. La diferencia en el impacto fisiológico entre NPs ZnO y ZnSO₄ se atribuye a una liberación más lenta y gradual del Zn⁺⁺ contenido en las NPs ZnO. Una investigación presentada por Reed *et al.* (2012) mencionó que la disolución de NPs ZnO en agua desionizada (DI) es relativamente

lenta y gradual, con solo un 2% total del Zn disuelto a partir de 24 h. Por el contrario, el ZnSO_4 es altamente soluble con muy poco tiempo de retención en el sistema de la planta, por lo tanto, la biodisponibilidad de Zn durante un período prolongado es ineficiente (Prasad *et al.*, 2012).

4.6.2 Contenido relativo de clorofila

El contenido relativo de clorofila se determinó mediante mediciones SPAD durante el desarrollo fenológico de las plantas. Como se muestra en la Figura 11c, los resultados indican que el contenido relativo de clorofila aumentó significativamente durante el desarrollo de las plantas y por la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO_4 en ambas concentraciones. No obstante, las hojas que acumularon el mayor contenido de clorofila fueron las tratadas con NPs ZnO a 1000 mg L^{-1} . Este comportamiento se presentó a partir de las etapas FL, DF y M, con incrementos de 19.4%, 22.9% y 16.2%, respectivamente, en comparación con el control. En contraste, las aplicaciones foliares para ambos tratamientos a 2000 mg L^{-1} mostraron reducciones: con NPs ZnO, el contenido de clorofila disminuyó en 8.5%, 4.3% y 6.2%, mientras que el ZnSO_4 causó reducciones del 12.2%, 14.4% y 8.4% en las etapas FL, DF y M, respectivamente, en comparación con el tratamiento que produjo la mayor acumulación (NPs ZnO 1000 mg L^{-1}).

Nuestros resultados son consistentes con Prasad *et al.* (2012), quienes reportaron un mayor contenido de clorofila (1.97 mg/g/rt.wt) en hojas de mani por la aplicación foliar

de NPs ZnO a 1000 mg L^{-1} (25 nm) en comparación con el ZnSO_4 . Mukherjee *et al.* (2016) en estudios realizados en plantas de chicharo verde (*Pisum sativum* L.) evaluaron el impacto de diferentes NPs ZnO (10 nm), 2% en peso de alúmina dopada (Al_2O_3 ZnO NPs, 15 nm), o 1% en peso de NPs recubiertas con aminopropiltrióxido de silano (KH550, ZnO NPs 20 nm) y Zn iónico (cloruro de Zn) a 1000 mg kg^{-1} , todos los tratamientos dieron como resultado de 2.4 a 3.6 veces incrementos en la acumulación de clorofila, en comparación con el control, aunque no hubo diferencias significativas entre los diferentes tipos de Zn. Los aumentos observados en el contenido de clorofila se deben al hecho de que el Zn desempeña un papel esencial en el metabolismo de las plantas, al influir en la actividad de enzimas importantes como la anhidrasa carbónica que contiene un átomo de Zn que cataliza la hidratación del CO_2 que facilita la difusión de dióxido de carbono a los sitios de carboxilación en las plantas (Badger y Price, 1994; Pullagurala *et al.*, 2018).

Lo anterior está de acuerdo con los hallazgos reportados por Pullagurala *et al.* (2018), quienes indicaron que la aplicación de NPs ZnO a 100 mg kg^{-1} , 200 mg kg^{-1} y 400 mg kg^{-1} aumentó el contenido relativo de clorofila en 41%, 37% y 58%, respectivamente, en comparación con las plantas del tratamiento control. Según Raliya y Tarafdar (2013), la aplicación foliar de NPs ZnO a 10 mg L^{-1} en plantas de *Cyamopsis tetragonoloba* L. aumentó significativamente la biomasa de la planta (27.1%) y el contenido de clorofila (276.2%). Por lo tanto, los aumentos observados en el crecimiento de la planta a una concentración de 1000 mg L^{-1} con NPs ZnO se deben al aumento en el contenido de clorofila, ya que es un indicador común de la

eficiencia fotosintética de una planta, y es uno de los factores determinantes de su crecimiento (García-Gómez *et al.*, 2017).

Si bien, el Zn es un micronutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las plantas (Narendhran *et al.*, 2016) y es necesario para la producción de clorofila (Cakmak, 2000), las respuestas perjudiciales en concentraciones elevadas de Zn pueden estar estrechamente relacionadas con la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Además, el desplazamiento de algunos otros metales de los sitios activos en proteínas (Moura *et al.*, 2012), pueden afectar la biosíntesis de clorofila y dañar el sistema fotosintético (Chaney, 1993). El contenido de clorofila se ha clasificado como un indicador confiable en relación con el tema de contaminación y toxicidad de los metales pesados en plantas (Tirani *et al.*, 2018). Por lo tanto, altos niveles de Zn en plantas pueden generar una reducción del contenido de clorofila como resultado de una respuesta al estrés oxidativo generado por este elemento.

4.6.3 Rendimiento del fruto y biomasa vegetal

Los resultados de las variables asociadas con el rendimiento y la acumulación de biomasa se presentan en el Cuadro 2. Para todas las variables evaluadas se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.01$); las plantas expuestas a la aplicación foliar de 1000 mg L^{-1} con NPs ZnO obtuvieron el mayor número de frutos, excediendo en 15.3% y 8.6% a las plantas del tratamiento control y las expuestas a ZnSO_4 . En contraste, a 2000 mg L^{-1} de NPs ZnO y ZnSO_4 hubo ligeras disminuciones (13.6% y

7.3%), en comparación con el tratamiento control. De modo similar, el máximo peso promedio del fruto se obtuvo con NPs ZnO a 1000 mg L⁻¹, superando en 7% al tratamiento control y 3.6% al ZnSO₄; mientras que a 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO y ZnSO₄ se presentan reducciones del 5.8% y 3.8% respectivamente, en comparación con el tratamiento control. La tendencia fue similar para el peso total de los frutos, alcanzando el máximo peso con NPs ZnO a 1000 mg L⁻¹ (Cuadro 2) excediendo en 21.2% al tratamiento control y 11.8% al ZnSO₄; mientras que a 2000 mg L⁻¹ en ambos tratamientos (NPs ZnO y ZnSO₄) mostraron disminuciones del 18.6% y 10.8% respectivamente, en comparación con el control.

Cuadro 2. Efecto de la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄ en el desarrollo de frutos y acumulación de biomasa

Tratamientos (mg L ⁻¹)	Número de frutos	Peso promedio de los frutos (g)	Peso total de los frutos (g)	Biomasa fresca aérea (g)	Biomasa seca aérea (g)
Control	54.20 ± 2.28 c	8.80 ± 0.22 ab	476.97 ± 23.74 ab	893.85 ± 11.00 b	294.80 ± 11.33 c
ZnSO ₄ 1000	58.50 ± 1.29 b	9.12 ± 0.11 ab	533.78 ± 11.93 ab	905.09 ± 5.88 b	310.81 ± 3.44 b
NPs ZnO 1000	64.00 ± 2.24 a	9.46 ± 0.12 a	605.30 ± 17.27 a	925.64 ± 4.09 a	324.91 ± 5.09 a
ZnSO ₄ 2000	50.25 ± 1.50 d	8.46 ± 0.07 b	425.20 ± 11.19 b	879.46 ± 5.99 c	278.56 ± 8.59 d
NPs ZnO 2000	46.80 ± 2.39 d	8.29 ± 0.11 b	387.99 ± 18.71 b	868.22 ± 2.42 c	264.42 ± 4.92 e

Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5) ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

El peso seco y fresco de la biomasa aérea, se afectó significativamente ($p \leq 0.01$) por la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄. Las plantas tratadas con 1000 mg L⁻¹ de NPs ZnO registraron el mayor incremento en la acumulación biomasa; en el caso del peso fresco se obtuvieron incrementos del 3.4% y 2.2%, mientras que el peso seco incrementó en 9.2% y 4.3% en comparación con el control y las concentraciones de ZnSO₄ en masa respectivas. En cambio, a 2000 mg L⁻¹ con NPs ZnO se obtuvieron

las mayores reducciones en la acumulación de biomasa fresca y seca; con disminuciones del 2.9% y 10.3% respectivamente, en comparación con el control.

En el presente estudio, la aplicación foliar de NPs ZnO a 1000 mg L^{-1} influyó positivamente en el crecimiento de las plantas de chile y la producción de frutos, demostrando efectos más favorables que el ZnSO_4 . La razón probablemente se deba a la mayor asimilación de Zn cuando se aplica en forma de NPs ZnO debido a su mayor capacidad para penetrar en la hoja (Rossi *et al.*, 2019). Pero, a concentraciones más elevadas (2000 mg L^{-1}) causaron toxicidad, estos resultados estuvieron de acuerdo con lo reportado por Lin y Xing (2007) en rábano, colza, maíz, lechuga y pepino. Prasad *et al.* (2012), mencionaron que las NPs ZnO son absorbidas por las plantas en mayor medida en comparación con ZnSO_4 , debido a una mayor biodisponibilidad por su tamaño y menor solubilidad en agua. Comprobando, que en plantas de mani la aplicación de 1000 mg L^{-1} con NPs ZnO demostró ser más efectiva para aumentar el crecimiento y rendimiento de la vaina en 34%, en comparación con el ZnSO_4 , pero a mayor concentración (2000 mg L^{-1}) las NPs ZnO fueron perjudiciales.

Resultados similares fueron obtenidos por Khanm *et al.* (2017) al tratar plantas de tomate con 1000 mg L^{-1} de NPs ZnO y, observaron que el crecimiento de la planta, rendimiento y acumulación de Zn aumentaron significativamente con respecto al ZnSO_4 y el control. Estos resultados confirmaron que los efectos fisiológicos estaban

relacionados con un mayor aprovechamiento de Zn, cuando se aplica con partículas de tamaño nanométrico.

La efectividad del ZnSO_4 por aplicación foliar es baja, debido a que es altamente soluble y permite que se lixivie rápidamente (Fageria *et al.*, 2002). Estas características afectan la disponibilidad de nutrientes. Los iones altamente solubles en agua pueden tener dificultades para penetrar la cutícula lipofílica de la hoja, lo que limita la disponibilidad en el caso de la fertilización con ZnSO_4 (Prasad *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que las NPs entran en las células a través del sistema estomatal o vascular (Raliya y Tarafdar, 2013; Wang *et al.*, 2013) dependiendo del rango de tamaño de las partículas de ZnO.

Esto respalda la hipótesis actual de la penetración de las NPs en la célula vegetal a través de la vía hidrofílica de los poros acuosos polares en la cutícula y los estomas (Eichert *et al.*, 2008; Eichert *et al.*, 2008). El diámetro de los poros cuticulares se ha estimado en 2 nm (Eichert *et al.*, 2008), y la vía estomática aparece como la ruta más factible para la penetración de NPs, con un límite de exclusión de tamaño superior a 10 nm (Eichert *et al.*, 2008). Sin embargo, hay algunos hallazgos alternativos en la literatura, que informaron que la aplicación foliar de NPs Au a 280 ng por planta en tamaños de 3, 10 y 50 nm, lograron penetrar la cutícula de la hoja independientemente de su tamaño y recubrimiento y, se acumularon principalmente en brotes jóvenes (10-30%), en las raíces (10-25%) y del 5 al 15% de las NPs <50 nm fueron exudadas al suelo de la rizosfera (Avellan *et al.*, 2019). Otros autores

mencionaron que las NPs en un rango de 4 a 100 nm pueden atravesar la cutícula de la hoja al romper la capa cerosa (Larue *et al.*, 2014). En este estudio, las NPs aplicadas estaban en un rango de 12 a 24 nm, por lo que existe la posibilidad de que las NPs ZnO de mayor tamaño (24 nm) puedan pasar a través de la cutícula de la hoja.

Aunque es probable que el tamaño y las propiedades de las NPs jueguen un papel importante en su interacción con las hojas de la planta, su absorción en la hoja y su transporte dentro de la planta están determinados por las diferentes características de la hoja (como los estomas, tricomas o cutículas), que presentan una amplia gama de diversidad entre las especies (Pérez-de-Luque, 2017; Avellan *et al.*, 2019). Por el contrario, la reducción en la acumulación de la biomasa podría deberse al mayor impacto negativo de las NPs ZnO, las concentraciones tóxicas (2000 mg L^{-1}) de Zn podrían afectar negativamente el contenido K^+ de las células, la permeabilidad y la conductividad hidráulica y el contenido de agua, lo que provoca una disminución en el peso fresco de los órganos, la tasa de movimiento de los asimilados de las hojas al fruto (Barceló y Poschenrieder, 1990).

4.6.4 Características cromáticas

La determinación de las características cromáticas de los frutos reveló diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre tratamientos para las variables L^* , b^* y C^* (Cuadro 3).

Aunque, en a^* y h^* los tratamientos fueron estadísticamente iguales, los valores presentaron tendencia a incrementar con las aplicaciones de NPs ZnO y ZnSO₄.

Los valores máximos de L^* , fueron detectados en los frutos provenientes de plantas tratadas con NPs ZnO a 2000 mg L⁻¹, con un valor de 53.46, lo que indica mayor luminosidad de los frutos al compararlos con los valores obtenidos en el tratamiento control y ZnSO₄. Los resultados de a^* y b^* presentaron la misma tendencia, con valores de 33.45 (a^*) y 43.59 (b^*), esto indica que la tendencia al color rojo y amarillo del fruto aumentó con la aplicación de NPs ZnO en altas concentraciones (2000 mg L⁻¹).

La saturación del color (C^*) presentó un patrón similar al de L^* ; con un valor de 53.43, esto significa que la intensidad del color anaranjado del fruto incrementó con NPs ZnO a 2000 mg L⁻¹. La determinación de h^* sirvió para diferenciar el color percibido en los frutos, con tendencia de color rojo a amarillo. En este trabajo, los valores de CIELAB (L^* , a^* , b^*) y CIELCH (L^* , C^* y h^*), fueron útiles para explicar las diferencias en el color del pericarpio de los frutos obtenidas de los diferentes tratamientos (Kim *et al.*, 2008).

Cuadro 3. Características cromáticas en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO₄

Tratamientos (mg L ⁻¹)	Parámetros cromáticos					Vista
	L*	a*	b*	C*	h*	
Control	50.02 ± 1.08 b	30.57 ± 1.93	38.92 ± 1.33 b	49.37 ± 1.97 b	51.77 ± 1.46	
ZnSO ₄ 1000	51.29 ± 1.76 b	32.06 ± 0.85	41.98 ± 1.11 a	50.77 ± 1.32 b	52.33 ± 1.00	
NPs ZnO 1000	51.99 ± 1.11 ab	32.33 ± 1.45	42.48 ± 2.13 a	51.81 ± 0.76 ab	53.71 ± 1.24	
ZnSO ₄ 2000	51.92 ± 1.46 ab	32.07 ± 0.84	41.91 ± 1.42 a	51.75 ± 1.01 ab	53.30 ± 1.25	
NPs ZnO 2000	53.46 ± 1.15 a	33.45 ± 1.20	43.59 ± 1.47 a	53.43 ± 1.64 a	53.84 ± 1.44	

Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5) ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Actualmente, no hay informes de la evaluación del color en frutos obtenidas de plantas sometidas a tratamientos con NPs metálicos. Sin embargo, en *Capsicum* el color del fruto está determinado principalmente por la composición y la concentración de carotenoides (Lightbourn *et al.*, 2008), la biosíntesis de estos compuestos y su acumulación en frutos está influenciada por diferentes factores como un mecanismo de defensa contra diversos estreses bióticos y abióticos (Aloni *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012).

García-Gómez *et al.* (2017) evaluó el efecto de las NPs ZnO y ZnSO₄ sobre las defensas antioxidantes en las plantas de tomate, los resultados indicaron que las NPs ZnO generaron una mayor toxicidad y estimularon la concentración de carotenoides y marcadores biológicos de estrés oxidativo (ERO). Algunos estudios han demostrado que las NPs ZnO pueden inducir estrés oxidativo y modificar la actividad de enzimas antioxidantes y compuestos antioxidantes no enzimáticos

(Wang *et al.*, 2016; García-López *et al.*, 2018), que operan en conjunto para proteger las células vegetales contra el daño oxidativo.

Pérez-Labrada *et al.* (2019) informaron que la aplicación foliar de NPs Cu indujo un aumento en el contenido de vitamina C y carotenoides (licopeno) en los frutos, en comparación con los niveles obtenidos en el tratamiento control. En este estudio, la evaluación del crecimiento de las plantas mostró una mayor sensibilidad a la aplicación de NPs ZnO, ya que a 1000 mg L^{-1} estimuló el crecimiento de las plantas, mientras que a 2000 mg L^{-1} hubo una reducción en el desarrollo de las plantas posiblemente debido a un efecto fitotóxico. Sin embargo, los frutos obtenidos en ambos tratamientos informaron los mayores aumentos en compuestos nutraceuticos y funcionales. Los incrementos observados en la acumulación de estos compuestos reflejan un estado redox modificado por la aplicación de NPs ZnO que afectan el nivel de ERO a nivel celular (Yang *et al.*, 2017). Por lo tanto, estos resultados sugieren que los frutos de las plantas tratadas con la aplicación foliar de NPs ZnO intensificaron su color naranja debido a una mayor producción de carotenoides en respuesta al estrés oxidativo.

La función principal de los carotenoides es la protección de las células y los orgánulos contra el daño oxidativo, que logran al interactuar con las moléculas de oxígeno singlete (O_2), eliminar los radicales peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) y prevenir su acumulación (Sandmann *et al.*, 1999). No obstante, la investigación del efecto de la aplicación de NPs ZnO sobre las características cromáticas de los frutos, la

acumulación de carotenoides y compuestos fenólicos es muy escasa, por lo tanto, el papel de los compuestos anteriores contra el estrés inducido por NPs metálicos es aún incierto (Yang *et al.*, 2017).

4.6.5 Calidad de los frutos de chile habanero

Los resultados que se presentan en el Cuadro 4 indican que la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄, afectó significativamente ($p \leq 0.01$) la AT de los frutos. La acidez máxima valorable (0.155 ± 0.0055) se obtuvo con 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO, mientras que el valor mínimo (0.119 ± 0.0050) de AT se obtuvo en los frutos del tratamiento control.

Además, el pH de los frutos también se vio afectado ($p \leq 0.01$) por los tratamientos con NPs ZnO y ZnSO₄ (Cuadro 4); el valor más alto se obtuvo con el tratamiento control (5.63 ± 0.114), mientras que el pH más bajo (5.40 ± 0.040) se encontró con las NPs ZnO a 2000 mg L⁻¹, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos basados en Zn con diferentes concentraciones. El pH del fruto, está correlacionado con la acidez y el contenido de ácido cítrico es el ácido orgánico primario que se encuentra en la mayoría de las frutas (Wang y Lin, 2002).

Cuadro 4. Efecto de la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄ en la calidad de los frutos de chile habanero

Tratamientos (mg L ⁻¹)	TA (%)	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Firmeza (N)	Fuerza de corte (N)
Control	0.119 ± 0.0050 d	5.63 ± 0.114 a	9.32 ± 0.79 d	14.79 ± 0.63 b	11.35 ± 0.83
ZnSO ₄ 1000	0.126 ± 0.0012 cd	5.49 ± 0.030 b	10.18 ± 0.38 c	14.94 ± 0.65 ab	11.39 ± 0.77
NPs ZnO 1000	0.134 ± 0.0025 b	5.42 ± 0.048 b	10.77 ± 0.60 b	15.11 ± 0.68 ab	11.43 ± 0.64
ZnSO ₄ 2000	0.130 ± 0.0020 bc	5.50 ± 0.025 b	10.48 ± 0.52 bc	15.20 ± 0.63 ab	11.36 ± 0.72
NPs ZnO 2000	0.155 ± 0.0055 a	5.40 ± 0.040 b	11.33 ± 0.72 a	15.35 ± 0.54 a	11.32 ± 0.47

Los valores son el promedio de cinco repeticiones. Medias (n = 5) ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Con respecto a los °Brix, todos los tratamientos mostraron valores más altos que el tratamiento control; el nivel de tratamiento con 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO produjo la mayor cantidad (11.33 ± 0.72), mientras que el valor menor se obtuvo en el control (9.32 ± 0.79). Como resultado, la fertilización con NPs ZnO y ZnSO₄ también aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) la firmeza del fruto; el mayor incremento (15.35 ± 0.54) se obtuvo con 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO, y el valor más bajo se ubicó (14.79 ± 0.63) en los frutos de las plantas del tratamiento control. Los resultados encontrados están de acuerdo con los obtenidos por Davarpanah *et al.* (2016), quienes mencionaron que la fertilización foliar con NPs ZnO a una concentración de 120 mg L⁻¹ condujo a mejoras significativas en la calidad de frutos de granada, incluyendo aumentos de 4.4-7.6% en °Brix, disminuciones de 9.5-29.1% en TA, aumentos de 20.6-46.1% en el índice de madurez e incrementos del 0.28-0.62% en el pH del jugo, mientras que las características físicas de los frutos no se vieron afectadas. Estudios previos, han informado que la aplicación foliar de micronutrientes como el Zn y Fe,

son esenciales para aumentar el rendimiento, la calidad y el contenido de ácido ascórbico en frutos de tomate (Gupta y Gupta, 2004).

En este estudio, los incrementos en °Brix y la firmeza de los frutos bajo fertilización con NPs ZnO y ZnSO₄ pueden atribuirse a que el Zn desempeña un papel vital en la síntesis y traslación de carbohidratos y proteínas (Yogeratnam y Greenham, 1982), además de mantener la estabilidad estructural de las membranas celulares (Welch *et al.*, 1982). Estos hechos indican, que la disponibilidad y la concentración del Zn por fertilización foliar en plantas con NPs ZnO durante las principales etapas de crecimiento vegetativo fue más efectiva, y tiene funciones fisiológicas muy importantes que pueden mejorar la calidad del fruto, atribuidas al envío de Zn desde los tejidos de las hojas a través del floema, hasta los frutos en el momento del desarrollo y maduración (Laware y Raskar, 2014).

4.6.6 Contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina

Los resultados indicaron que el contenido de capsaicina se vió afectado significativamente ($p \leq 0.01$) por la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄ (Figura 12a); la mayor acumulación se detectó a 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO (625.44 ± 14.47 mg kg⁻¹), siendo 19.3% más alto que el tratamiento control (504.60 ± 16.73 mg kg⁻¹). La misma tendencia se observó para el contenido de dihidrocapsaicina, a pesar de que los tratamientos fueron estadísticamente iguales ($p \leq 0.423$), la acumulación se incrementó en ambos tratamientos (Figura 12a). El tratamiento a 2000 mg L⁻¹ de NPs

ZnO provocó el mayor aumento con 10.9% ($326.71 \pm 6.50 \text{ mg kg}^{-1}$), en comparación con el control ($290.84 \pm 2.80 \text{ mg kg}^{-1}$).

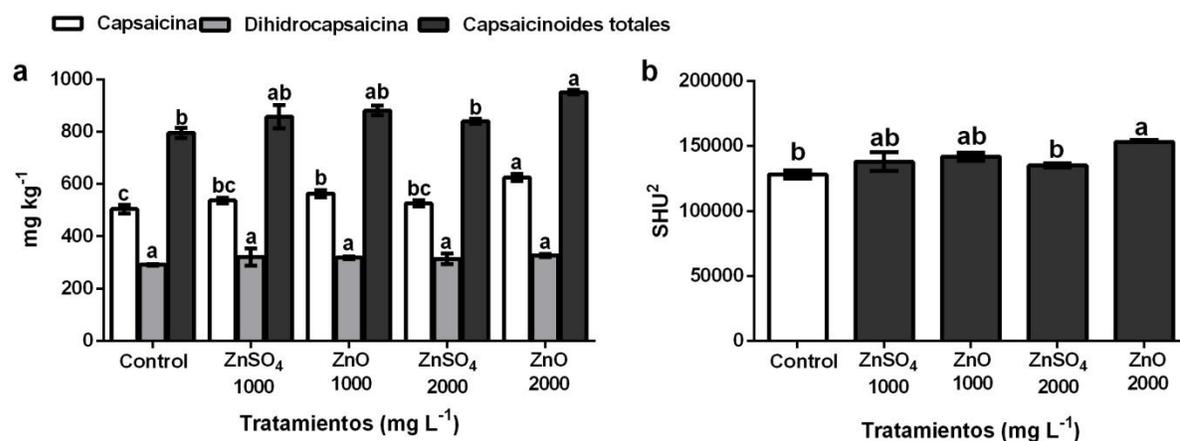


Figura 12. Contenido de capsaicinoides en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO₄. (a) capsaicina, dihidrocapsaicina y capsaicinoides totales, (b) Unidades de Picor Scoville (SHU²). Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n=3), las barras representan la desviación estándar de la media. Letras diferentes en cada barra significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

El análisis cuantitativo de los capsaicinoides por HPLC, reveló que el contenido total de estos compuestos aumentó en los frutos obtenidos de las plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO₄ (Figura 12a); la mayor concentración de capsaicinoides se detectó en frutos maduros que provenían de las plantas sometidas a 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO, con un valor máximo ($952.15 \pm 8.17 \text{ mg kg}^{-1}$), que excede en 16.4% en relación con el control ($795.43 \pm 19.54 \text{ mg kg}^{-1}$). El cromatograma mostrado en la Figura 13a, corresponde a la preparación de estándares de capsaicina y la dihidrocapsaicina, con tiempos de retención de 6.354 min (pico 1) y 9.661 min (pico 2), respectivamente.

Existe una relación directa entre el nivel de capsaicinoides totales y la pungencia en frutos de chile. Las SHU² de los frutos también aumentaron significativamente ($p \leq 0.01$) al aplicar las NPs ZnO y ZnSO₄ en todas las concentraciones (Figura 12b); el mayor incremento de 16.4% (153296 ± 1315.79 SHU²), se obtuvo a una concentración de 2000 mg L⁻¹ con NPs ZnO, mientras que el control presentó la menor acumulación (128065 ± 3146.931 SHU²).

Por otro lado, los valores obtenidos para SHU² con ZnSO₄ a 2000 mg L⁻¹ no mostraron aumentos significativos. La escala SHU es una medida de la pungencia de los chiles, que está en función de la concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina. La SHU se puede clasificar en: (1) no picante (0–700 SHU²), (2) levemente picante (700–3000 SHU²), (3) moderadamente picante (3000–25,000 SHU²), (4) altamente picante (25,000–70,000 SHU²) y (5) muy picantes (>80,000 SHU²) (Weiss, 2012).

Con base en nuestros resultados y en la escala SHU, los frutos de chile habanero cosechados en este estudio están clasificados como frutos muy picantes, no obstante, la concentración de capsaicinoides totales se incrementó en mayor medida con la aplicación de las NPs ZnO a altas concentraciones (2000 mg L⁻¹), lo que resultó en incrementos de las SHU.

Lo anterior se debe, a que los capsaicinoides son uno de las principales antioxidantes del chile, Pinedo-Guerrero *et al.* (2017), y una de sus funciones es la protección contra las ERO (Antonious, 2009). Por lo tanto, es posible que el mayor

incremento observado en estos compuestos se deba al estrés oxidativo que generan las NPs ZnO (García López *et al.*, 2018), debido a que las NPs metálicas desencadenan alteraciones en los niveles de Ca^{2+} y ERO implicados en la señalización celular y en complejas modificaciones fisiológicas y bioquímicas a nivel del organismo (Sosan *et al.*, 2016).

En este caso, el sistema de defensa de las plantas genera una mayor acumulación de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, lo que resultó en una mayor acumulación de capsaicinoides (Figura 12). Las Figuras 13b, c y e muestran los cromatogramas y los tiempos de retención para los compuestos de los frutos del control y los tratamientos con ZnSO_4 , mientras que las figuras 13d y f representan los tiempos de retención obtenidos para los tratamientos con NPs ZnO.

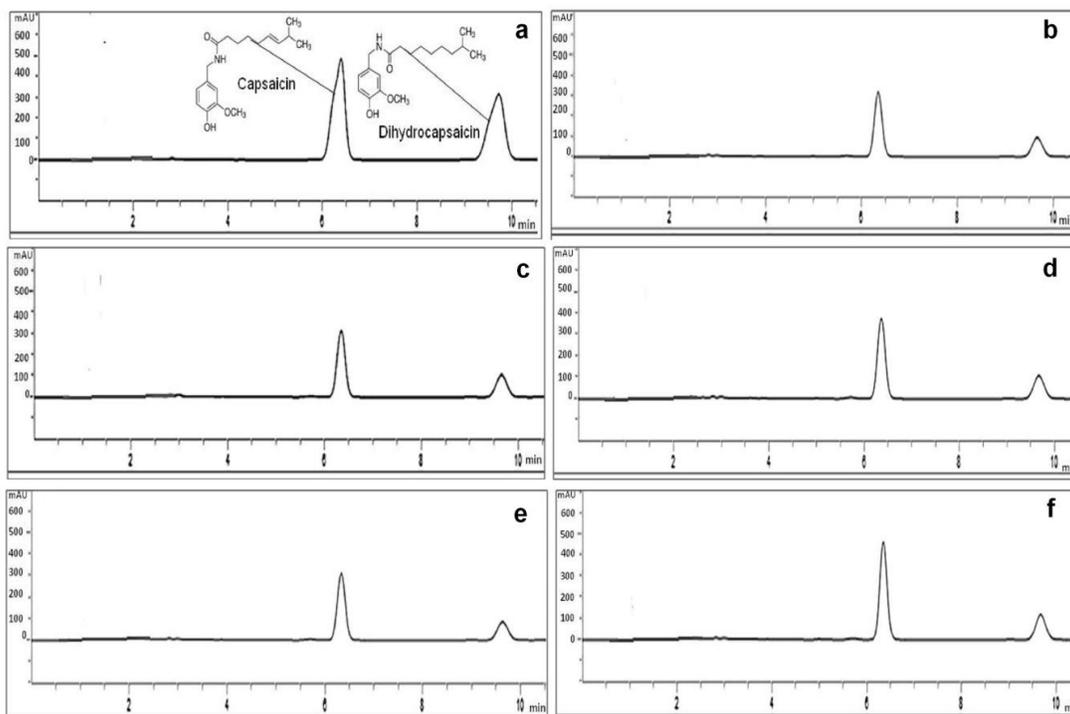


Figura 13. Cromatogramas para capsaicina y dihidrocapsaicina, en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO₄: (a) estándares; (b) control; (c) 1000 mg L⁻¹ ZnSO₄; (d) 1000 mg L⁻¹ NPs ZnO; (e) 2000 mg L⁻¹ ZnSO₄; (f) 2000 mg L⁻¹ NPs ZnO.

4.6.7 Contenido de fenoles y flavonoides totales

Los resultados indican que la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄, afectó significativamente ($p \leq 0.01$) el contenido de fenoles y flavonoides totales (solubles + ligados) de los frutos. En todos los análisis de compuestos fenólicos, la porción soluble presentó los niveles más altos de fenoles y flavonoides, mientras que la de menor concentración fue la ligada. El mayor contenido de fenoles totales (solubles + ligados), se obtuvo con las aplicaciones de NPs ZnO: en el tratamiento con 1000 mg L⁻¹ el contenido fue de 1442.76 mgGAE kg⁻¹, mientras que para 2000 mg L⁻¹ fue de 1504.60 mgGAE kg⁻¹ (Cuadro 5), excediendo 10.8% y 14.5% al tratamiento control. Los niveles obtenidos con ZnSO₄ fueron de 1290.55 mgGAE kg⁻¹ para 1000 mg L⁻¹ y

1299.93 mgGAE kg⁻¹ para 2000 mg L⁻¹, al compararlos con los valores obtenidos con NPs ZnO en las mismas concentraciones presentan 10.5% y 13.6% menor cantidad, respectivamente.

Cuadro 5. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales (solubles + ligados) en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO₄

Tratamientos (mg L ⁻¹)	Fenoles totales (mgGAE kg ⁻¹)			Flavonoides totales (mgCatE kg ⁻¹)		
	Solubles	Ligados	Total	Solubles	Ligados	Total
Control	1154.85 ± 10.55 b	113.50 ± 4.30 b	1286.35 b	114.35 ± 5.52 b	69.30 ± 2.71 c	183.65 b
ZnSO ₄ 1000	1168.44 ± 17.76 b	122.11 ± 6.55 b	1290.55 b	116.95 ± 10.22 b	79.28 ± 5.83 bc	196.24 b
NPs ZnO 1000	1293.42 ± 28.30 a	149.34 ± 6.45 a	1442.76 a	144.63 ± 9.53 a	92.54 ± 5.39 ab	237.17 a
ZnSO ₄ 2000	1176.24 ± 15.61 b	123.68 ± 4.98 b	1299.93 b	119.73 ± 6.89 a	76.62 ± 4.43 c	196.35 b
NPs ZnO 2000	1347.41 ± 30.06 a	157.18 ± 7.58 a	1504.60 a	155.01 ± 8.04 a	96.50 ± 6.20 a	251.50 a

Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n = 3) ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Este comportamiento también se observó para el contenido de flavonoides totales (Cuadro 5). La mayor concentración de flavonoides totales (solubles + ligados) se ubicó a 1000 y 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO, con valores de 237.17 mgCatE kg⁻¹ y 251.50 mgCatE kg⁻¹, respectivamente, excediendo en 22.5% y 26.9% al tratamiento control. Por el contrario, los valores obtenidos con ZnSO₄ a 1000 mg L⁻¹ (196.24 mgCatE kg⁻¹) y 2000 mg L⁻¹ (196.35 mgCatE kg⁻¹), fueron 21.9% y 17.2% menores que los valores obtenidos en las mismas concentraciones con las NPs ZnO y, al compararlos con los valores obtenidos por el control no hay diferencias estadísticas significativas.

El contenido de compuestos fenólicos se considera uno de los parámetros de valor nutracéutico más importantes en los frutos de chile habanero (Castro-Concha *et al.*, 2014). Se han encontrado concentraciones similares de compuestos fenólicos en frutos de chile habanero anaranjado (169.97 mg GAE 100 g⁻¹), mientras que otros genotipos de chiles habaneros cultivados en Yucatan, México, presentan concentraciones más bajas (20.54 a 20.75 mg 100 g⁻¹) (Campos *et al.*, 2013). La presencia de taninos condensados no se detectó en ninguna de las muestras.

En este estudio, los efectos causados (beneficiosos y tóxicos) por la aplicación foliar de NPs ZnO en plantas fueron mayores que los causados por ZnSO₄ en las mismas concentraciones. Por ejemplo, la mayor acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides totales se obtuvo en los frutos cosechados de las plantas que fueron tratadas con 1000 y 2000 mg de L⁻¹ de NPs ZnO. A la fecha, no hay informes que comparen el efecto de las NPs ZnO y ZnSO₄ sobre la acumulación de compuestos bioactivos en los frutos de chile habanero; sin embargo, nuestros hallazgos sugieren que el efecto podría estar relacionado con un mecanismo específico de las NPs en el sistema de la planta, ya que los tratamientos con NPs ZnO generaron los mayores cambios fisiológicos y bioquímicos en las plantas.

Algunos autores mencionaron que la toxicidad generada por las NPs ZnO se debe a la internalización de las NPs, la acumulación en el tejido y la disolución de los iones de Zn (Lopez-Moreno *et al.*, 2010), esto sugiere que las NPs ZnO pueden inducir

toxicidad a través de la actividad de los iones que liberan durante un período prolongado y pueden generar una mayor estimulación en la formación de ERO.

Además, la diferencia en la acumulación de compuestos fenólicos causados por NPs ZnO difiere de los causados por el ZnSO₄ en las mismas concentraciones (1000 y 2000 mg L⁻¹), esto puede explicarse por qué el ZnSO₄ es altamente soluble y cuando se aplica a las hojas de las plantas puede caer rápidamente, por lo tanto, la biodisponibilidad de iones Zn con el uso de ZnSO₄ durante un período prolongado no es segura (Doolette *et al.*, 2018; Kah *et al.*, 2018). Por lo tanto, es importante tener en cuenta que la aplicación foliar de ZnSO₄ no podría generar el mismo estrés que los iones obtenidos por las NPs ZnO, ya que las NPs tienen un mayor potencial de transporte y, por lo tanto, una mayor biodisponibilidad y absorción que les permite interactuar con estructuras intracelulares que estimulan la formación de ERO (Kouhi *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2016). Sin embargo, otros autores enfatizaron que la fitotoxicidad causada por las NPs ZnO no puede explicarse solo por los iones disueltos, ya que las propiedades de las NPs pueden verse afectadas por los medios de exposición a las plantas (Zafar *et al.*, 2016; García-Gómez *et al.*, 2018).

Zafar *et al.* (2016), indicaron que la aplicación de NPs ZnO indujo estrés oxidativo en los brotes de *Brassica nigra* y, curiosamente, observaron un aumento en las moléculas antioxidantes no enzimáticas como los compuestos fenólicos y los flavonoides debido a la acumulación de ERO. Los resultados del experimento realizado por Pinedo-Guerrero *et al.* (2017) también informaron que la aplicación de

NPs Cu en hidrogeles de quitosano-PVA a una concentración de 2.0 mg en plantas de chile jalapeño aumentó la acumulación de fenoles en los frutos (64.71 mgGAE 100 g⁻¹), superando en 5.9% al control, el aumento se asoció con un incremento en el estrés oxidativo generado por ERO.

Las plantas han desarrollado varios mecanismos de protección para limitar el daño oxidativo causado por ERO a través de la producción de antioxidantes como fenoles, carotenoides y enzimas antioxidantes (García-López *et al.*, 2018). Los compuestos fenólicos desempeñan un papel destacado en los mecanismos de desintoxicación de ERO (Mahendra *et al.*, 2008) como donadores de electrones en las estructuras de orgánulos y pueden eliminar directamente las especies moleculares de oxígeno activo, principalmente debido a sus propiedades redox. Además, actúan en la absorción y neutralización de los radicales libres, la extinción de oxígeno singlete y triplete o la descomposición de peróxidos (Sora *et al.*, 2015). Este comportamiento explica la mayor acumulación de fenoles y flavonoides en los frutos obtenidos de las plantas expuestas a tratamientos con NPs ZnO.

4.6.8 Capacidad antioxidante

En el Cuadro 6, se observan diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre los tratamientos en los ensayos de capacidad antioxidante de ABTS, DPPH y FRAP. En todos los análisis, la porción soluble fue la que presentó los niveles más altos de capacidad antioxidante. Los resultados indican que la actividad antioxidante total (solubles +

ligados) fue de 83.28 a 98.49, de 145.29 a 213.16 y de 235.25 a 296.06 mmolTE kg⁻¹ en ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad antioxidante en frutos de chile habanero obtenidos de plantas tratadas con NPs ZnO y ZnSO₄

Tratamientos (mg L ⁻¹)	ABTS (mmolTE kg ⁻¹)		DPPH (mmolTE kg ⁻¹)		FRAP (mmolTE kg ⁻¹)	
	Solubles	Ligados	Solubles	Ligados	Solubles	Ligados
Control	76.60 ± 3.19 b	6.68. ± 4.30 c	112.97 ± 5.52 b	32.32 ± 2.71 c	172.75 ± 4.68 b	61.50 ± 3.25 b
ZnSO ₄ 1000	83.33 ± 3.18 ab	7.95 ± 6.55 b	121.67 ± 10.22 b	35.60 ± 5.83 c	180.86 ± 5.19 b	65.19 ± 3.51 b
NPs ZnO 1000	86.77 ± 2.75 a	8.75 ± 6.45 ab	154.98 ± 9.53 a	49.70 ± 5.39 b	198.22 ± 5.14 a	80.51 ± 0.66 a
ZnSO ₄ 2000	81.08 ± 3.18 ab	8.12 ± 4.98 b	130.31 ± 6.89 b	38.19 ± 4.43 c	180.30 ± 6.73 b	67.61 ± 3.08 b
NPs ZnO 2000	89.14 ± 2.96 a	9.35 ± 7.58 a	156.55 ± 8.04 a	56.61 ± 6.20 a	212.21 ± 8.35 a	83.85 ± 1.97 a

Los valores son el promedio de tres repeticiones. Medias (n = 3) ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna significan que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

De acuerdo con los resultados del contenido fenólico, los tres métodos de capacidad antioxidante mostraron los valores más altos en los tratamientos con NPs ZnO a concentraciones de 1000 y 2000 mg L⁻¹, y resultaron estadísticamente diferentes del control y los tratamientos con ZnSO₄ (Cuadro 6). Las correlaciones entre el contenido fenoles totales ($r=0.95$, 0.94 y $r=0.80$, respectivamente), flavonoides totales ($r=0.95$, 0.89 y $r=0.80$, respectivamente) y la capacidad antioxidante medida por FRAP, DPPH y ABTS sugieren que los valores de compuestos fenólicos más altos en los frutos de chile habanero está relacionados con una mayor capacidad antioxidante. Se han reportado patrones similares en frutos de chile jalapeño (Pinedo-Guerrero *et al.*, 2017), en pimientos del genero *Capsicum* (Sora *et al.*, 2015), chiles jalapeños y serranos (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

Estudios previos, han demostrado que las NPs ZnO pueden generar citotoxicidad por la producción de ERO (Kumar *et al.*, 2018), la inducción y la biosíntesis de los compuestos fenólicos se relacionan con el estrés causado por los metales pesados, esto puede explicar la gran acumulación de estos compuestos en los frutos que provenían de plantas expuestas a NPs ZnO (Parry *et al.*, 1994), lo que podría ser la razón principal de los incrementos observados en las actividades antioxidantes (Tarzi *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Zare *et al.* (2018) demostraron que las NPs ZnO sintetizadas mostraron una mayor actividad antioxidante (ABTS y DPPH) en comparación con las micropartículas de ZnO, la efectividad biológica y antioxidante de las NPs ZnO depende de su tamaño y forma de las partículas (Singh *et al.*, 2017). En este estudio, la aplicación de NPs ZnO generó la mayor acumulación de compuestos fenólicos en los frutos, lo que resultó en incrementos de las actividades antioxidantes.

4.7 Conclusiones

La aplicación de NPs ZnO afectó el desarrollo de plantas de chile habanero: a una concentración de 1000 mg L⁻¹, promovió el crecimiento de las plantas y aumentó el número y el peso promedio de los frutos, mientras que a 2000 mg L⁻¹ generó efectos negativos sobre el crecimiento y el desarrollo del cultivo. Por lo tanto, el efecto de las NPs ZnO depende de la concentración aplicada. En contraste, el efecto de la aplicación de ZnSO₄ a concentraciones de 1000 y 2000 mg L⁻¹ fue menor y tuvo efectos menores en el rendimiento del cultivo. Por otro lado, la aplicación foliar de

NPs ZnO a 2000 mg L⁻¹ condujo a mejoras significativas en la calidad del fruto, incluidos aumentos en TA, °Brix y disminuciones en el pH, sin diferencias significativas entre los tratamientos con Zn. Asimismo, la acumulación de capsaicinoides totales en frutos de plantas tratadas con 1000 y 2000 mg L⁻¹ de NPs ZnO alcanzó 881.57 y 952.15 mg Kg⁻¹, respectivamente, lo que resultó en aumentos significativos de SHU². Del mismo modo, la aplicación de NPs ZnO a 1000 y 2000 mg L⁻¹ aumentó el contenido de fenoles y flavonoides totales (solubles + ligados) en frutos de chile habanero, lo que resultó en una mayor capacidad antioxidante según los ensayos ABTS, DPPH y FRAP.

En resumen, los resultados de este estudio demuestran la influencia de la aplicación foliar de NPs ZnO y ZnSO₄ en el desarrollo y rendimiento de las plantas de chile habanero.

4.8 Referencias

- Aloni, B., Karni, L., Deventurero, G., Turhan, E., & Aktas, H. 2008. Changes in ascorbic acid concentration, ascorbate oxidase activity, and apoplastic pH in relation to fruit development in pepper (*Capsicum annuum* L.) and the occurrence of blossom-end rot. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(1), 100-105.
- Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Amarowicz, R., & Shahidi, F. 2010. Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeno and serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 163-173.
- Antonious, G. F., Lobel, L., Kochhar, T., Berke, T., & Jarret, R. L. 2009. Antioxidants in *Capsicum chinense*: Variation among countries of origin. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 44(6), 621-626.

- AOAC. 2000. Vitamin and other nutrient. In Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International, 17th ed.; Hoerwitz, W., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
- Avellan, A., Yun, J., Zhang, Y., Spielman-Sun, E., Unrine, J. M., Thieme, J., & Lowry, G. V. 2019. Nanoparticle size and coating chemistry control foliar uptake pathways, translocation and leaf-to-rhizosphere transport in wheat. *ACS Nano*.
- Badger, M. R., & Price, G. D. 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 45(1), 369-392.
- Barceló, J. U., & Poschenrieder, C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 13(1), 1-37.
- Bhumi, G., Raju, R. Y., & Savithramma, N. 2014. Screening of zinc oxide nanoparticles for cell proliferation synthesized through *Adhatoda vasica* nees. *Int. J. Drug Dev. & Res*, 6(2), 97-104.
- Cakmak, I. 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification?. *Plant and Soil*, 302(1-2), 1-17.
- Calmak, I. 2000. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. *New Phytol*, 146, 185-205.
- Campos, M. R. S., Gómez, K. R., Ordoñez, Y. M., & Ancona, D. B. 2013. Polyphenols, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruit. *Food and Nutrition Sciences*, 4(08), 47.
- Castro-Concha, L. A., Tuyub-Che, J., Moo-Mukul, A., Vazquez-Flota, F. A., & Miranda-Ham, M. L. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Chaney, R. L. 1993. Zinc phytotoxicity. In *Zinc in soils and plants* (pp. 135-150). Springer, Dordrecht.
- ColorHexa. Color Encyclopedia: Information and Conversion. Computer Software. 2019. Available online: <https://www.colorhexa.com/> (accessed on, 31 January 2019).
- Commission Internationale De L'eclairage. Cie 15: 2004. Technical Report: Colorimetry, Commission Internationale De L'eclairage, 3rd ed.; CIE: Vienna, Austria.

- Davarpanah, S., Tehranifar, A., Davarynejad, G., Abadía, J., & Khorasani, R. 2016. Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruit yield and quality. *Scientia horticulturae*, 210, 57-64.
- De Rosa, M. C., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R., & Sultan, Y. 2010. Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnology*, 5(2), 91.
- Doolette, C. L., Read, T. L., Li, C., Scheckel, K. G., Donner, E., Kopittke, P. M., & Lombi, E. 2018. Foliar application of zinc sulphate and zinc EDTA to wheat leaves: differences in mobility, distribution, and speciation. *Journal of Experimental Botany*, 69(18), 4469-4481.
- Eichert, T., & Goldbach, H. E. 2008. Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces-further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum*, 132(4), 491-502.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., & Goldbach, H. E. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*, 134(1), 151-160.
- Elibox, W. 2015. Morphological changes associated with postharvest fruit deterioration and physical parameters for early determination of shelf life in *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience*, 50(10), 1537-1541.
- Fageria, N. K., Baligar, V. C., & Clark, R. B. 2002. Micronutrients in crop production. In *Advances in Agronomy* (Vol. 77, pp. 185-268). Academic Press.
- Fernández, V., & Brown, P. H. 2013. From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Frontiers in Plant Science*, 4, 289.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., & Fernández, M. D. 2017. Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Science of the Total Environment*, 589, 11-24.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., & Fernández, M. D. 2018. Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown in a calcareous soil and an acidic soil. *Science of the Total Environment*, 644, 770-780.
- García-López, J. I., Lira-Saldivar, R. H., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Niño-Medina, G., Angélica Ruiz-Torres, N., & Díaz-Barriga, E. 2018. Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(5-7), 560-572.

- García-López, J., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldívar, R., Díaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N., & Niño-Medina, G. 2018. Zinc oxide nanoparticles boosts phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum* L. during germination. *Agronomy*, 8(10), 215.
- Ghiassi-Tarzi, B. G., Gharachorloo, M., Baharinia, M., & Mortazavi, S. A. 2012. The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 11(4), 1137.
- Ghosh, M., Jana, A., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A., Chakraborty, A., & Mukherjee, A. 2016. Effects of ZnO nanoparticles in plants: cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807, 25-32.
- Gupta, P. K., & Gupta, A. K. 2004. Studies of PGR and micronutrient mixtures on vitamin C content in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) products. *Indian Journal of Horticulture*, 61(1), 102-103.
- Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., & Bucheli, T. D. 2018. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 13(8), 677.
- Khan, N., Malik, A. B., Makbdoom, M. I., & Hag, A. 1993. Investigations on the efficiency of exogenous synthetic growth regulators on fruit drop in mango (*Mangifera indica* L.). *Egypt. J. Hort*, 20, 1-14.
- Khanm, H.; Vaishnavi, B.A.; Namratha. M.R.; Shankar. A.G. 2017. Nano zinc oxide boosting growth and yield in tomato: The rise of nano fertilizer era. *IJASR*, 7, 197-206.
- Kim, S., Youl Ha, T., & Park, J. 2008. Characteristics of pigment composition and colour value by the difference of harvesting times in Korean red pepper varieties (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 43(5), 915-920.
- Kisan, B., Shruthi, H., Sharanagouda, H., Revanappa, S. B., & Pramod, N. K. 2015. Effect of nano-zinc oxide on the leaf physical and nutritional quality of spinach. *Agrotechnology*, 4, 1-3.
- Kouhi, S. M. M., Lahouti, M., Ganjeali, A., & Entezari, M. H. 2015. Comparative effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk particles, and Zn²⁺ on *Brassica napus* after long-term exposure: changes in growth, biochemical compounds, antioxidant enzyme activities, and Zn bioaccumulation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(11), 364.

- Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Trcera, N., Sorieul, S., Cécillon, L., & Sarret, G. 2014. Fate of pristine TiO₂ nanoparticles and aged paint-containing TiO₂ nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 17-26.
- Laware, S. L., & Raskar, S. 2014. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth, flowering and seed productivity in onion. *International Journal of Current Microbiology Science*, 3(7), 874-881.
- Li, C., Wang, P., Lombi, E., Cheng, M., Tang, C., Howard, D. L., & Kopittke, P. M. 2018. Absorption of foliar-applied Zn fertilizers by trichomes in soybean and tomato. *Journal of Experimental Botany*, 69(10), 2717-2729.
- Lightbourn, G. J., Griesbach, R. J., Novotny, J. A., Clevidence, B. A., Rao, D. D., & Stommel, J. R. 2008. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *Journal of Heredity*, 99(2), 105-111.
- Lin, D., & Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243-250.
- Liu, R., & Lal, R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*, 514, 131-139.
- Lopez-Contreras, J. J., Zavala-Garcia, F., Urias-Orona, V., Martinez-Avila, G. C. G., Rojas, R., & Guillermo, N. M. 2015. Chromatic, phenolic and antioxidant properties of Sorghum bicolor genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 366-370.
- López-Gómez, J. D., Villegas-Torres, O. G., Nava, H. S., Rodríguez, M. A., & Juárez, P. 2017. Yield and quality of habanero chili (*Capsicum chinense* Jacq.) by effect of nutritional regimen. *REMEXCA*, 8, 1747-1758.
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J. Á., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental Science & Technology*, 44(19), 7315-7320.
- Ma, H., Williams, P. L., & Diamond, S. A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles—a review. *Environmental Pollution*, 172, 76-85.
- Mahendra, S., Zhu, H., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. 2008. Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environmental Science & Technology*, 42(24), 9424-9430.

- Mengel, K.; Kirkby, E.A. 1987. Principles of Plant Nutrition; 5th ed.; International Potash Institute, Springer Science Business Media: Worblaufen, Switzerland, pp. 585-596.
- Moura, D. J., Péres, V. F., Jacques, R. A., & Saffi, J. 2012. Heavy metal toxicity: oxidative stress parameters and DNA repair. In Metal toxicity in plants: Perception, signaling and remediation (pp. 187-205). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mukherjee, A., Sun, Y., Morelius, E., Tamez, C., Bandyopadhyay, S., Niu, G., & Gardea-Torresdey, J. L. 2016. Differential toxicity of bare and hybrid ZnO nanoparticles in green pea (*Pisum sativum* L.): A life cycle study. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1242.
- Narendhran, S., Rajiv, P., & Sivaraj, R. A. 2016. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth of *Sesamum indicum* L. in zinc deficient soil. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8(3), 365-371.
- Nhan, L. V., Ma, C., Rui, Y., Liu, S., Li, X., Xing, B., & Liu, L. 2015. Phytotoxic mechanism of nanoparticles: destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. *Sci Rep UK* 5: 11618.
- Park, S., Jeong, W. Y., Lee, J. H., Kim, Y. H., Jeong, S. W., Kim, G. S., & Shin, S. C. 2012. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 130(4), 981-985.
- Parry, A. D., Tiller, S. A., & Edwards, R. 1994. The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, 106(1), 195-202.
- Pavani, K., Divya, V., Veena, V., Adity, I., & Devakinandan, M. 2014. Influence of bioengineered zinc nanoparticles and zinc metal on *cicer arietinum* seedlings growth. *Asian J Agri Biol*, 2(4), 216-223.
- Pérez-de-Luque, A. 2017. Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture?. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 12.
- Pérez-Labrada, F., López-Vargas, E. R., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., & Juárez-Maldonado, A. 2019. Responses of tomato plants under saline stress to foliar application of copper nanoparticles. *Plants*, 8(6), 151.
- Pinedo-Guerrero, Z. H., Hernández-Fuentes, A. D., Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., & Cadenas-Pliego, G. 2017. Cu nanoparticles in hydrogels of

- chitosan-PVA affects the characteristics of post-harvest and bioactive compounds of jalapeño pepper. *Molecules*, 22(6), 926.
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., & Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 905-927.
- Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videoa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. 2018. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 120-127.
- Qados, A. M. A. 2015. Mechanism of nanosilicon-mediated alleviation of salinity stress in faba bean (*Vicia faba* L.) plants. *American Journal of Experimental Agriculture*, 7(2), 78-95.
- Raliya, R., & Tarafdar, J. C. 2013. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Agricultural Research*, 2(1), 48-57.
- Read, T. L., Doolette, C. L., Cresswell, T., Howell, N. R., Aughterson, R., Karatchevtseva, I., & Lombi, E. 2019. Investigating the foliar uptake of zinc from conventional and nano-formulations: a methodological study. *Environmental Chemistry*.
- Reed, R. B., Ladner, D. A., Higgins, C. P., Westerhoff, P., & Ranville, J. F. 2012. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), 93-99.
- Rengel, Z. 2001. Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(7-8), 1163-1186.
- Rossi, L., Fedenia, L. N., Sharifan, H., Ma, X., & Lombardini, L. 2019. Effects of foliar application of zinc sulfate and zinc nanoparticles in coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 160-166.
- Ryu, W. K., Kim, H. W., Kim, G. D., & Rhee, H. I. 2017. Rapid determination of capsaicinoids by colorimetric method. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(4), 798-803.
- Sadeghzadeh, B., Rengel, Z. 2011. Zinc in soils and crop nutrition. In *Molecular Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*; Hawkesford, M.J., Barraclough, P., Eds; Wiley: London, UK; pp. 335–376.

- Sandmann, G., Albrecht, M., Schnurr, G., Knörzer, O., & Böger, P. 1999. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 17(6), 233-237.
- Simonovska, J., Škerget, M., Knez, Ž., Srbinoska, M., Kavrakovski, Z., Grozdanov, A., & Rafajlovska, V. 2016. Physicochemical characterization and bioactive compounds of stalk from hot fruits of *Capsicum annuum* L. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(2), 199-208.
- 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. *Journal of Materials Science*, 53(1), 185-201.
- Singh, D., & Kumar, A. 2016. Impact of irrigation using water containing CuO and ZnO nanoparticles on *Spinach oleracea* grown in soil media. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(4), 548-553.
- Singh, R. S., & Ram, S. 1983. Studies on the use of plant growth substances for fruit retention in mango cv. Dashehari. *Ind. J. Hort*, 40(3/4), 188.
- Sora, G. T. S., Haminiuk, C. W. I., da Silva, M. V., Zielinski, A. A. F., Gonçalves, G. A., Bracht, A., & Peralta, R. M. 2015. A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and in vitro antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8086-8094.
- Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., & Colbeck, I. 2016. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 85(2), 245-257.
- Steiner, A.A.A. 1961. Universal method for preparing nutrients solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*, 15, 134-154.
- Tirani, M. M., Haghjou, M. M., Sulieman, S., & Ismaili, A. 2018. Comparative evaluation of zinc oxide effects on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) grown in different media. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 20(4).
- Todd Jr, P. H., Bensinger, M. G., & Biftu, T. 1977. Determination of pungency due to *Capsicum* by gas-liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 42(3), 660-665.
- Torabian, S., Zahedi, M., & Khoshgoftar, A. H. 2016. Effects of foliar spray of two kinds of zinc oxide on the growth and ion concentration of sunflower cultivars under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 39(2), 172-180.

- Tucuch, C. J., Alcántar-González, G., Ordaz-Chaparro, V. M., Santizo-Rincón, J. A., & Larqué-Saavedra, A. 2012. Production and quality of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) with different $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratios and size of substrate particles. *Terra Latinoamericana*, 30(1), 9-15.
- Wang, P., Lombi, E., Sun, S., Scheckel, K. G., Malysheva, A., McKenna, B. A., & Kopittke, P. M. 2017. Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environmental Science: Nano*, 4(2), 448-460.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. 2016. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in Plant Science*, 21(8), 699-712.
- Wang, P., Menzies, N. W., Lombi, E., McKenna, B. A., Johannessen, B., Glover, C. J., & Kopittke, P. M. 2013. Fate of ZnO nanoparticles in soils and cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Science & Technology*, 47(23), 13822-13830.
- Wang, S. Y., & Lin, S. S. 2002. Composts as soil supplement enhanced plant growth and fruit quality of strawberry. *Journal of Plant Nutrition*, 25(10), 2243-2259.
- Weiss, E.A. *Spice Crops*; CABI Publishing International: New York, NY, USA, 2002; p. 411.
- Welch, R. M. 1982. Zinc in membrane function and its role in phosphorous toxicity. In 9th Conf. Commonwealth Agricultural Bureau, Colloquium, Warwick, England, pp. 710-715.
- Yang, J., Cao, W., & Rui, Y. 2017. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 158-169.
- Yogeratnam, N.; Greenham, D.W.P. 1982. The application of foliar sprays containing N, Mg, Zn and B to Apple trees. I. Effect on fruit set and cropping. *J. Hortic. Sci.* 1982, 57, 151-154.
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 7, 535.
- Zare, M., Namratha, K., Byrappa, K., Surendra, D. M., Yallappa, S., & Hungund, B. 2018. Surfactant assisted solvothermal synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antimicrobial and antioxidant properties. *Journal of Materials Science & Technology*, 34(6), 1035-1043.

Zuverza-Mena, N., Medina-Velo, I. A., Barrios, A. C., Tan, W., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. 2015. Copper nanoparticles/compounds impact agronomic and physiological parameters in cilantro (*Coriandrum sativum*). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(10), 1783-1793.

4.9 Consideraciones finales

El uso de nanopartículas metálicas en la agricultura ha aumentado continuamente con el empleo de nanofertilizantes y nanopesticidas que permiten eficientar la nutrición y el rendimiento de los cultivos; sin embargo, a la fecha no existen regulaciones ambientales establecidas para la liberación de este tipo de materiales. En esta investigación, se evaluaron los efectos de nanomateriales (NPs ZnO) y metales basados en Zn (ZnSO_4) sobre parámetros agronómicos y bioquímicos en diferentes etapas fenológicas del cultivo de chile habanero (*C. chinense*).

Como se esperaba, durante la etapa de germinación las NPs ZnO a concentraciones de 100 a 300 mg L^{-1} , estimularon el vigor y el crecimiento de las plántulas. Además, de incrementar la actividad del sistema enzimático antioxidante y no enzimático, lo cual generó la acumulación de metabolitos secundarios deseables como los compuestos fenólicos y flavonoides que resultaron en una mayor capacidad antioxidante. No obstante, en concentraciones de 400 a 500 mg L^{-1} , los parámetros agronómicos revelaron que las NPs ZnO generaron posiblemente fitotoxicidad mostrando una disminución en el crecimiento de las plántulas.

Por otra parte, durante la investigación realizada en condiciones de invernadero, los efectos causados (benéficos y tóxicos) en las plantas por la aplicación foliar de NPs ZnO fueron mayores que los causados por el ZnSO_4 en las mismas concentraciones. Las NPs ZnO a una concentración de 1000 mg L^{-1} afectaron positivamente la altura

de la planta, el diámetro del tallo y el contenido de clorofila, y aumentaron el rendimiento del fruto y la acumulación de biomasa en comparación con los tratamientos control y ZnSO_4 . Por el contrario, las NPs ZnO a 2000 mg L^{-1} afectaron negativamente el crecimiento de las plantas pero aumentaron significativamente la calidad de los frutos, el contenido de capsaicinoides, compuestos fenólicos y una mayor capacidad antioxidante.

Los resultados obtenidos en esta investigación enriquecen la información científica sobre las interacciones del sistema NPs ZnO -planta, y además pueden emplearse como un patrón de referencia para la producción de chile habanero con el fin de mejorar la producción de plántulas, el rendimiento, la calidad y las propiedades nutraceuticas de los frutos. Para la producción de plántulas se recomiendan concentraciones de 100 a 300 mg L^{-1} , debido a que a estas concentraciones pueden incrementar el vigor y el crecimiento de las plántulas, mientras que, para la etapa de crecimiento vegetativo y reproductivo se recomienda una concentración de 1000 mg L^{-1} , ya que los resultados indicaron que fue el tratamiento con los mejores resultados en cuanto a crecimiento, rendimiento y acumulación de clorofila.

Para finalizar, es importante mencionar que los efectos que pueden causar las NPs ZnO en las plantas son variables. Además de las características del nanomaterial, los impactos también dependen de las especies de planta y las condiciones del medio ambiente.

Apéndice I

Artículos publicados

TOXICOLOGICAL & ENVIRONMENTAL CHEMISTRY
<https://doi.org/10.1080/03272248.2018.1550781>



Check for updates

Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*

Josué Israel García-López^a, Ricardo Hugo Lira-Saldivar^b, Francisco Zavala-García^a, Emilio Olivares-Sáenz^c, Guillermo Niño-Medina^a, Norma Angélica Ruiz-Torres^c, Bulmaro Méndez-Argüello^b and Enrique Díaz-Barriga^b

^aFacultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Nuevo León, Mexico; ^bCentro de Investigación en Química Aplicada, Departamento de Agrobiotecnología, Saltillo, Mexico; ^cCentro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Mexico

ABSTRACT

The effects of suspensions of zinc oxide nanoparticles at concentrations between 100 and 500 mg L⁻¹ on germination of *Capsicum chinense* seeds and vigor of plants were evaluated using a randomized complete design with four replications, resulting in increased germination and improved development of lengths of plumule and radicle. The activities of peroxidase, catalase and ascorbate peroxidase were determined, showing that at all concentrations the activities of the former two enzymes were increased, whereas the activity of the latter was reduced at 500 mg L⁻¹. Pretreatments of seeds with ZnO nanoparticles can improve germination and development of seedlings and the activities of antioxidant enzymes.

ARTICLE HISTORY

Received 28 June 2018
 Revised 12 November 2018
 Accepted 16 November 2018

KEYWORDS

Nanotechnology; nanofertilizers; *Capsicum chinense*

Introduction

Nanomaterials have great potential to modify conventional agricultural practices. Iron, copper, cerium, silver, zinc and titanium derived nanoparticles are being used as fertilizers (Liu and Lal 2015) or pesticides (Grillo, Abhilash, and Fraceto 2016). Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) proved to influence plant anatomy, biochemistry, and physiology (Zafar et al. 2016). ZnO NPs have been shown to be antimycotic agents controlling infection and propagation of fungal plant pathogens such as *Penicillium expansum*, *Bortrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium culmorum* (Devipriya and Roopan 2017; Hao et al. 2017).

ZnO NPs also have been shown to increase seed germination rates (Rawat et al. 2018) and to promote plumule and radicle growth, as well as biomass accumulation of plants (Janmohammadi and Sabaghnia 2015; Razaq et al. 2015). Probably due to its nature as an essential micronutrient, zinc plays a major role in plant functioning.

CONTACT Ricardo Hugo Lira-Saldivar hugo.lira@ciqa.edu.mx Centro de Investigación en Química Aplicada, Departamento de Agrobiotecnología, 25294 Saltillo, Mexico.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

like in auxin regulation by means of tryptophan synthesis and by being a cofactor in the redox enzymes superoxide dismutase and dehydrogenases (Narendhran, Rajiv and Sivaraj 2016).

Venkatachalam et al. (2017) also demonstrated the growth enhancement of ZnO NPs in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. In a similar way, Elizabeth et al. (2017) verified that ZnO NPs stimulate some yield attributes like number of flowers and fruits; however, other metals such as copper oxide nanoparticles at 1000 mg L^{-1} induced significant inhibition on seeds germination and seedlings growth of *Vigna radiata* (Singh et al. 2017). Additional metallic NPs such as ferric oxide (Fe_2O_3), and titanium oxide (TiO_2) also inhibited the germination of *Oryza sativa* seeds (Hao et al. 2016). Likewise, Priester et al. (2012) detected plant growth and diminished yield of *Glycine max* plants exposed to CeO_2 NPs. As a result, the findings from different researchers suggest both positive and negative effects on plant growth and development by NPs, and it seems that their influence on plants depends on the composition, concentration, size and physical and chemical properties of NPs as well as plant species (Siddiqui et al. 2015).

The positive effects of NPs on plants are a result of the fact that the materials applied at nanoscale change their physical, chemical and biological characteristics, as well as their catalytic properties, which, in turn, affect chemical and biological activities, such as the increase of nitrate reductase in plants. This improves their ability to absorb and make use of water and fertilizers, along with the stimulation of antioxidant systems (Qados 2015).

Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of ZnO NPs on seed germination, seedling growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*, since habanero pepper is an important crop with increasing demand on Mexican and international markets and because, despite its growing importance, no research has been done concerning the responses of *C. chinense* to ZnO NPs.

Materials and methods

Genetic material

The variety of *C. chinense* used was Chichen Itza (Seminis, St. Louis, MO, USA), a vigorous and early maturing plant which may be cropped up to 2 weeks before other varieties. The fruits have three locules and an attractive orange color, characterized by its high spiciness ranking 10,500 Scoville heat units when fresh and up to 200,000 when dry.

Characterization of nanoparticles

ZnO NPs purchased from Nanostructured and Amorphous Materials Inc. (Houston, TX, USA) were morphologically and structurally characterized by transmission electron microscopy (TEM) and high resolution TEM (HRTEM), and by selected area diffraction (SAED) with an electron microscope at 300 kV (FEI-TITAN 80–300 kV, Fisher Scientific, Hillsboro, OR, USA). TEM and HRTEM micrographs were

processed by means of fast Fourier transform software (Digital Micrograph 3.7.0, Gatan Software, Pleasanton, CA, USA).

Treatments

ZnO NPs suspensions with size of 18 ± 8 nm were prepared. The initial concentration was 2000 mg L^{-1} , prepared in sterile deionized water and dispersed with a probe sonicator (Q500-110, Qsonica, Newtown, CT, USA) for 25 min. The suspension was diluted, and samples of 100, 200, 300, 400 and 500 mg L^{-1} were used. The dispersion time and concentrations were standardized through a preliminary experiment.

Seed germination and seedling growth

The seeds were counted in lots of 100 per treatment, dissection forceps were used to place the seeds in $15 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ polyethylene terephthalate containers on two layers of filter papers (Whatman, diameter 90 mm). Treatments used were as follows: 100 mg L^{-1} (T2), 200 mg L^{-1} (T3), 300 mg L^{-1} (T4), 400 mg L^{-1} (T5) and 500 mg L^{-1} (T6) of ZnO NPs suspensions. Control seeds (T1) were treated with distilled water. Treatments were applied once during the imbibition stage with a pipette (PIPETMAN Classic 1–10 mL, Gilson, Middleton, WI, USA). Ten milliliters of ZnO NPs suspension at the concentrations mentioned above were added for each treatment. The seeds were placed for 72 h into a test chamber (model Equitek EGCS 3S, 301 3SHR, Equitek, Guadalajara, México) at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ with a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness.

Once the period of imbibition of the seed was completed, four replicates of 25 seeds per treatment were planted on Anchor paper (Seedburo Equipment Company, Hidalgo, TX, USA). The Anchor paper was moistened with distilled water, then 25 seeds were placed horizontally on the paper, taking care that the seed embryo was located downwards; then another paper of the same size was moistened to cover the seeds. Subsequently, they were folded into a roll of 4 cm width, placed into polyethylene terephthalate baskets of 20 cm width \times 45 cm height, and taken back into the test chamber for 14 days.

The bioassay was developed according to ISTA rules (2004). Vigor (V %) was determined as percentage of normal seedlings of the total number of seedlings, and germination rate (G %), as percentage of germinated seeds of the total number of seeds, recorded 7 and 14 d after seeding; fresh biomass per seedling was determined after 14 days (Corral-Díaz et al. 2014). Normal seedlings were those that had root and plumule, each of them with a total development of 2.0 cm. Plumule length was measured from the root-hypocotyl intersection up to the cotyledon base, whereas radicle length was measured from the hypocotyl base until radicle apex. Fresh biomass of normal seedlings was determined at the end of the bioassay with an analytical balance.

Enzymatic activities

At the end of the assays, the plantlets were placed in polyethylene bags and frozen with liquid nitrogen. Samples were processed to determine peroxidase (POD),

ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activity. Therefore, 200 mg of tissue (plumule and radicle) were used for protein extraction according to Elavarthi and Martin (2010). In a pre-frozen mortar, the tissue was ground with liquid nitrogen adding 0.1% polyvinylpyrrolidone, the samples were collected in centrifugation microtubes, and 1 mL extraction buffer (phosphate buffer 100 mmol L⁻¹, pH 7, supplemented with EDTA 0.1 mmol L⁻¹) was added to each sample. The mixtures were centrifuged at 1200rpm for 5 min at 4 °C. Supernatants were stored at -20 °C.

POD activity

The activity of POD was determined according to Kwak et al. (1995) using pyrogallol as substrate. The reaction volume was 3 mL which contained 15 µL protein extract, 2.5 mL of phosphate buffer (pH 8, 100 mmol L⁻¹), 320 µL of 5% pyrogallol and was reacted with 165 µL of H₂O₂ to 0.147 mmol L⁻¹ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The reaction was started by H₂O₂ addition, and the absorbance increase was measured at 420 nm every 20 s for 1 min. One unit of POD activity is defined as 1.0 mg of purpurogallin formed in 20 s at pH 6 at $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

APX activity

APX activity was determined as described by Nakano and Asada (1981); following the absorbance decrease at 290 nm due to ascorbate oxidation. The reaction mixture consisted 15 µL of protein extract, 885 µL of phosphate buffer (pH 7, 50 mmol L⁻¹), 50 µL of 10 mmol L⁻¹ ascorbic acid and reacted with 50 µL to 10 mmol L⁻¹ H₂O₂. The APX activity was expressed as the amount of protein that produces 1 mmol oxidized ascorbate per minute ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

CAT activity

The H₂O₂ decomposition was measured by the decrease in absorbance at 240 nm according to Elavarthi and Martin (2010). The reaction mixture consisted of 15 µL of the protein extract, 965 µL of phosphate buffer (pH 7, 50 mmol L⁻¹) and reacted with 20 µL of 0.5 mmol L⁻¹ H₂O₂ in a reaction volume of 1 mL ($\epsilon = 0.04 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized design with six treatments and four repetitions was employed; the general linear model was $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$, where the response variable is Y_{ij} , μ the overall average, α_i the effect of ZnO NPs concentrations and e_{ij} the experimental error. The experimental unit consisted of an Anchor paper roll containing 25 habanero seeds.

The data assessments were assessed by analysis of variance and the average comparison of the treatments by the Tukey test ($p \leq 0.05$) (SPSS Statistics, 21 Version). To assess the possible linear (L), quadratic (Q) or cubic (C) trends of each variable and treatment, an orthogonal polynomial analysis was conducted. In the analysis of orthogonal polynomials, the trends L, Q and C were considered significant at a level of $p \leq 0.05$.

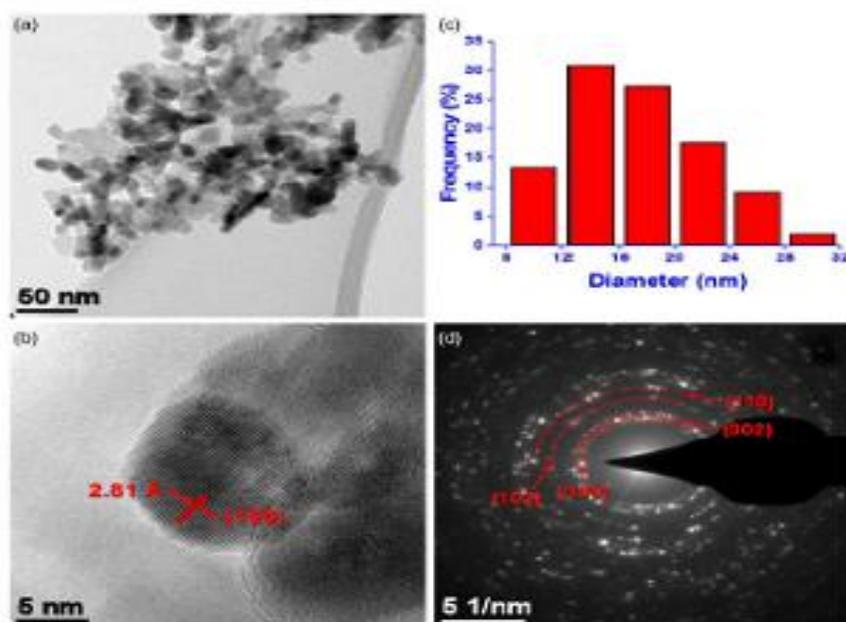


Figure 1. The micrographs of ZnO NPs: typical TEM image (a) and HRTEM (b). Size distribution of NPs (c). Typical SAED pattern for the area observed in panel (a,d), 5 1/nm corresponds to the real network vector and the reciprocal space.

Results and discussion

ZnO NPs characterization

In the TEM image of ZnO NPs sample (Figure 1(a)), the quasi-spherical morphology of the NPs can be identified which appear scattered on the microscope grid. In Figure 1(b), a representative TEM image of a NP is shown; lattice strips with a spacing of 2.81 Å can be observed, corresponding to lattice planes {100} of the ZnO hexagonal structure. In Figure 1(c), the size distribution of NPs after 300 NPs counted is shown.

Most of the particles (~75%) had diameters of 12–24 nm, and ~30% displayed sizes larger than 12 nm and smaller than 20 nm. In Figure 1(d), a SAED pattern of the ZnO sample, with irregular rings associated with planes (100), (002), (102) and (110) of the crystalline structure.

Effect of ZnO NPs on seed germination and vigor

In Figure 2, the effects of ZnO NPs on variables associated with the physiological quality of seeds are displayed. For vigor, an increasing linear trend can be observed

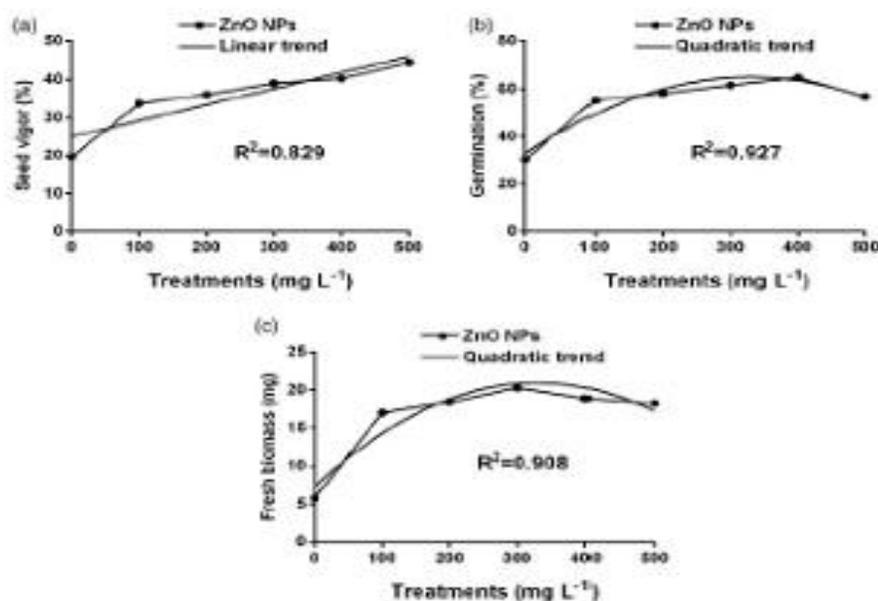


Figure 2. ZnO NPs concentration dependence and analysis of orthogonal polynomials for V %, G % and Fresh biomass (mg).

($p \leq 0.01$); as the concentrations of ZnO NPs increased, the seed vigor improved (Figure 2(a)). The strongest increase was found at a concentration of 500 mg L⁻¹, exceeding the control treatment (0 mg L⁻¹) by 126%. Regarding germination and fresh biomass, significant differences ($p \leq 0.01$) and quadratic trends ($p \leq 0.01$) are observed. It is important to note that, as ZnO NPs levels increased in a range of 100–400 mg L⁻¹, fresh biomass was positively affected (Figure 2(b)). The maximum biomass was attained at 400 mg L⁻¹, as it exceeded the control (0 mg L⁻¹) by 114%; at a concentration of 500 mg L⁻¹, a small reduction by 9% compared to 400 mg L⁻¹ was found.

Seedling growth presented a similar trend; at concentrations of 100, 200 and 300 mg L⁻¹ there was an increase (Figure 2(c)); the highest growth was attained with 300 mg L⁻¹, exceeding the control treatment (0 mg L⁻¹) by 250%. However, at 400 and 500 mg L⁻¹, there was a slight decrease (7% and 11%, respectively), compared to the 300 mg L⁻¹ treatment, at which the highest effect was observed. Analogous results were reported by Burman, Saini and Kumar (2013), since the maximum response with respect to shoot dry weight was observed in chickpea seedlings treated with 1.5 mg L⁻¹ ZnO NPs, whereas at 10 mg L⁻¹ the NPs exerted opposing effects on root growth. This has also been reported by Rameshraddy et al. (2017), showing that germination and seedling growth are stimulated at low concentrations of ZnO NPs, whereas high concentrations may be phytotoxic. In the present study, there was a clear response of the habanero pepper seeds to NPs treatments; a strong effect was

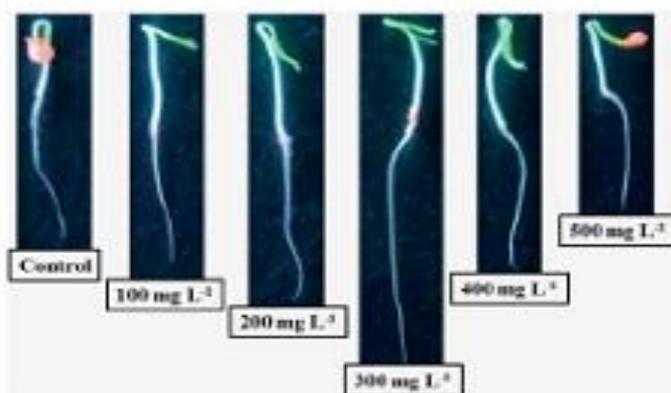


Figure 3. Plumule and radicle length of *C. chinense* seedlings due to the effect of five ZnO NPs concentrations.

detected on some physiological and biochemical traits. In Figure 3, the effects of NPs concentrations on vigor and seedling growth are shown.

Pandey, Sanjay and Yadav (2010) and Prasad et al. (2012) previously reported the encouraging effect on germination by ZnO NPs on chickpea and peanut seeds. The apparent reason for the stimulating effect on germination is the penetration of the NPs into the seeds which allows water and micronutrient Zn imbibition, accelerating mobilization of reserves supporting the first stages of the germination process (Lin and Xing 2007). The presence of ZnO NPs during germination leads to hormone biosynthesis, especially auxins and gibberellins, which promote the seed reserves mobilization, resulting in seedlings with greater length as well as promotion of growth and yield (El-Kereti et al. 2013).

Krishna and Natarajan (2014) suggested that the beneficial effects of ZnO NPs could be ascribed to a higher activation of enzymes like α and β amylase which are responsible for the metabolic reactions at the germination stage. Moreover, the level of indole acetic acid in roots and sprouts could be increased which in turn raise seed germination vigor and seedling growth. Thus, the improvement of the characters associated with physiological quality of the seeds is attributed to the fact that metallic NPs induce photosterilization reactions and photogeneration of ROS like superoxide and hydroxide anions which in turn stimulate ion penetration and promote water and oxygen imbibition, necessary for faster germination (Gokak and Taranath 2015). On the other hand, Hatami, Ghorbanpour and Salehianjemand (2014) stated that TiO₂ NPs application stimulated seedling germination of medicinal and aromatic plants, but this response was dependent on NPs concentration and plant genotype.

Almutairi and Alharbi (2015) pointed out that the use of nanomaterials is increasing because of their positive impact on different sectors, including agriculture. When they used silver NPs the emergence of *Zea mays*, *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* plants was facilitated. Enhanced growth and yield on some crops may be linked to the potential nutritional value of NPs, especially for the micronutrients essential for growth and defense (Servin et al. 2015).

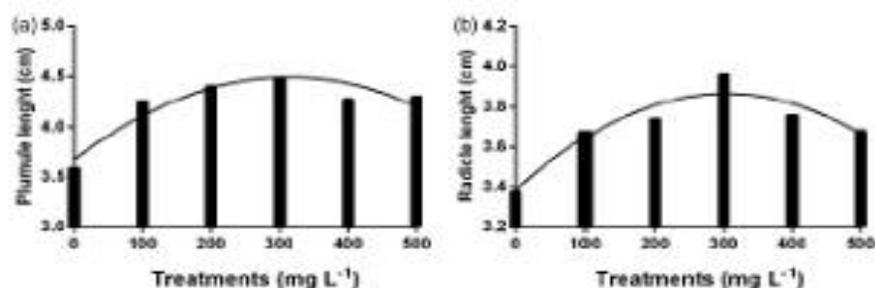


Figure 4. Quadratic linear regression for the variables radicle and plumule length in *C. chilense* seedlings.

Plumule and radicle length

ZnO NPs positively influenced plumule length (Figure 4(a)), reaching 4.5 cm at 300 mg L⁻¹, exceeding the control seedlings by 3.4 cm, or 25%. At 400 and 500 mg L⁻¹, plumule lengths were 4.3 cm or 4.5% shorter than at 300 mg L⁻¹. The maximum point estimate for the quadratic model function was 310 mg L⁻¹. The trend was similar for radicle growth, also showing a quadratic effect (Figure 4(b)). Radicle growth increased up to 300 mg L⁻¹ ZnO NPs, reaching 4 cm exceeding the control (3.4 cm) by 17%; while at 400 and 500 mg L⁻¹ decreased by 5% and 7% compared 300 mg L⁻¹, the maximum estimated using a quadratic model (Figure 4).

It is known that ZnO NPs promote the growth of seedlings and plants (Siddiqui et al. 2015). Prasad et al. (2012) showed that treatment with ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹ improved physiological and biochemical properties in peanut seeds, resulting in a vigor increase as well as root and stem elongation, in contrast to the present work in which greater ZnO NPs concentration adversely affected the lengths of radicles. This result is in line with previous reports; for instance, Boonyantipong et al. (2011) stated that 500 mg L⁻¹ of ZnO NPs inhibited roots elongation of *Oryza sativa* seedlings. In a similar way, the effect of ZnO NPs on *Allium cepa* seedlings revealed that plantlet development increased at concentrations 10–20 µg mL⁻¹ of ZnO NPs, diminishing at concentrations 30 and 40 µg mL⁻¹, which suggest phytotoxic effects (Raskar and Laware 2014). In addition, Lin and Xing (2007) demonstrated that 2000 mg L⁻¹ prevented root growth in *Raphanus sativus* and *Lolium perenne* seedlings, noticing that this occurred during seeds incubation and not during the imbibition period.

In studies conducted by Narendhran, Rajiv and Sivraj (2016) stated that the application of ZnO NPs extended the length of the roots of *Sesamum indicum* to 0.1, 0.25 and 0.5 mg L⁻¹, and at concentrations of 1.0 and 2.0 mg L⁻¹, they describe a decrease. However, it is difficult to establish a response model of the effects of ZnO NPs on the physiology of plants, since the effect depends on the species and concentration (Lin and Xing 2007; Arruda et al. 2015). Our results suggest that the low concentrations of ZnO NPs (100–300 mg L⁻¹) induced the growth of the plumule and radicle, whereas higher concentrations (400–500 mg L⁻¹) inhibit the growth of the seedlings (Figure 3).

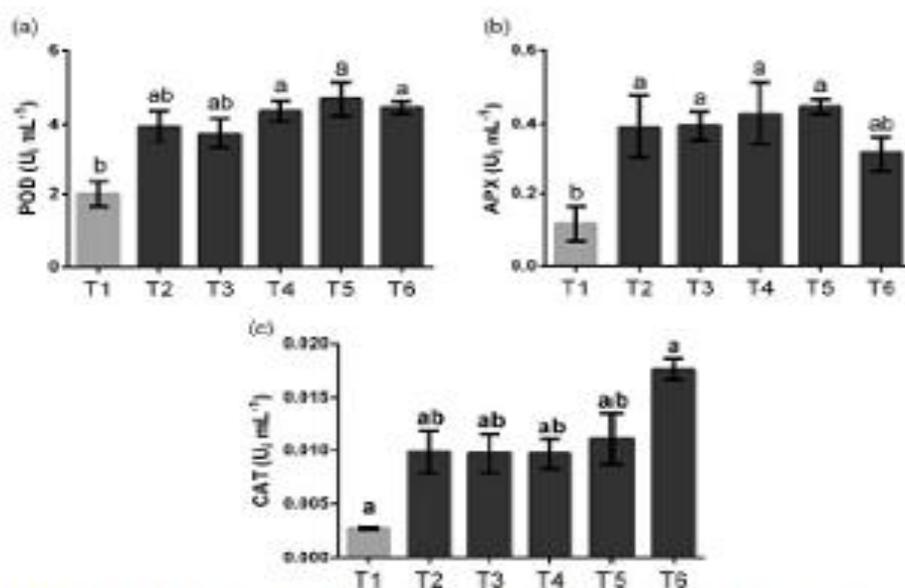


Figure 5. Antioxidant enzyme activity in *C. chinense* seedlings treated with ZnO NPs. (a) peroxidase (POD) activity, (b) ascorbate peroxidase (APX) activity, (c) catalase (CAT) activity. T1 = 0 mg L⁻¹, T2 = 100 mg L⁻¹; T3 = 200 mg L⁻¹; T4 = 300 mg L⁻¹; T5 = 400 mg L⁻¹; T6 = 500 mg L⁻¹. The values are averages of four replicates (n = 4), bars represent standard error of the mean, different letters are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Antioxidant enzyme activity

Antioxidant enzyme activities were analyzed to determine possible phytotoxic effects of ZnO NPs. In comparison with control, all ZnO NPs treatments entailed a significant increase ($p \leq 0.05$) in POD activity (Figure 5(a)). The highest activity was detected at the concentration of 400 mg L⁻¹ (4.7 ± 0.5 U_i mL⁻¹), being 2.3 times or 135% higher than control (2.0 ± 0.4 U_i mL⁻¹).

This suggests that ZnO NPs stimulated the antioxidant defense system, being the first toxic effect detected when NPs enter seeds and plants (López-Moreno et al. 2010; Ghosh et al. 2016). In a similar way, Dimkpa et al. (2012) noticed that in *Triticum aestivum* application of 500 mg L⁻¹ ZnO NPs increased POD activity. This enzyme is part of the antioxidant defense system, converting H₂O₂ into water and oxygen, providing protection against oxidative damage (Manke, Wang and Rojanasakul 2013; Chang et al. 2012).

The increase in APX and CAT activities (Figure 5(b,c)) was similar to that of POD. ZnO NPs produced a concentration-dependent increase in APX activity of *C. chinense* seedlings; at 400 mg L⁻¹ concentration a four-fold increase or 300% (0.45 ± 0.02 U_i mL⁻¹) was found compared to control (0.11 ± 0.05 U_i mL⁻¹) and at 500 mg L⁻¹ the activity of APX decreased to 0.31 ± 0.05 U_i mL⁻¹. CAT activity (Figure 5(c)) at 500 mg L⁻¹ ZnO NPs the maximum value (0.18 ± 0.01 U_i mL⁻¹), exceeding 6.4-fold (544%) relative to control (0.003 ± 0.0001 U_i mL⁻¹).

As the amount of ROS increases, the activity of APX was lowered. Interestingly, at the same circumstances, the CAT enzyme activity was increased, which probably indicate that the antioxidant enzyme system is adapting to counteract excessive production of ROS. As previously demonstrated, when the cellular concentration of ROS increases due to biotic and abiotic stresses, the balance of antioxidant defense systems in plants can be inhibited or modulated to avoid oxidative stress that causes lipid peroxidation, protein oxidation and the inhibition of antioxidant enzymes (Sharma et al. 2012; Prakash and Chung 2016).

Conclusions

In this work, all treatments with ZnO NPs had a promoting effect on germination, as well as in seeds vigor and seedlings growth, therefore, they have great potential to enhance agriculture as nanofertilizer. The increase of ZnO NPs in a range from 0 to 300 mg L⁻¹, improved the development of plumule and radicle, while at 400 and 500 mg L⁻¹, presented a decrease in both tissues. As a result, high concentrations of ZnO NPs could be toxic for habanero chili plants growth. The results also noticed that by increasing ZnO NPs there was a significant increase in the activity of antioxidant enzymes, such as POD, APX and CAT, associated with oxidative stress. These results contribute to explain the effect of ZnO NPs on germination and seeds vigor, besides the possible phytotoxic effects on seedlings.

Acknowledgements

This material is based upon work supported by the project No. 268 from Fronteras de la Ciencia-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

Disclosure statement

We declare that all Authors have seen and approved the manuscript being submitted, and also declare no competing financial interest. We also warrant that the article has not received prior publication and is not under consideration for publication elsewhere.

ORCID

Ricardo Hugo Lira-Saldivar <http://orcid.org/0000-0002-8045-2052>.

Funding

We thank to the Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) from Escobedo, N.L., Mexico. J.I.G.-L. acknowledges the doctorate scholarship 306970 given by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

References

- Almutairi, Z. M., and A. Alharbi. 2015. "Effect of Silver Nanoparticles on Seed Germination of Crop Plants." *International Journal of Nuclear and Quantum Engineering* 9 (6):586–90. doi 10.1999/1307-6892/10001458.

- Arruda, S. C., A. L. D. Silva, R. M. Galazzi, R. A. Azevedo, and M. A. Z. Arruda. 2015. "Nanoparticles Applied to Plant Science: A Review." *Talanta* 131:693–705. doi:org/10.1016/j.talanta.2014.08.050.
- Boonyanitipong, P., B. Kositsup, P. Kumar, S. Barnah, and J. Dutta. 2011. "Toxicity of ZnO and TiO₂ Nanoparticles on Germinating Rice Seed *Oryza sativa* L." *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 1 (4):282–5. doi:10.7763/IJBBB.2011.V1.53.
- Burman, U., M. Saini, and P. Kumar. 2013. "Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Antioxidant System of Chickpea Seedlings." *Toxicological & Environmental Chemistry* 95 (4):605–12. doi:10.1080/02727248.2013.803796.
- Chang, Y. N., M. Zhang, L. Xia, J. Zhang, and G. Xing. 2012. "The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles." *Materials* 5 (12):2850–71. doi:10.3390/ma5122850.
- Corral-Díaz, B., J. R. Peralta-Videa, E. Alvarez-Parrilla, J. Rodrigo-García, M. I. Morales, P. Osuna-Avila, G. Niu, J. A. Hernandez-Viecas, and J. L. Gardea-Torresdey. 2014. "Cerium Oxide Nanoparticles Alter the Antioxidant Capacity but Do Not Impact Tuber Ionomer in *Raphanus sativus* (L)." *Plant Physiology and Biochemistry* 84:277–85. doi:10.1016/j.plaphy.2014.09.018.
- Devipriya, D., and S. M. Roopan. 2017. "Cistus quadrangularis Mediated Ecofriendly Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles and Its Antifungal Studies against *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*." *Materials Science and Engineering for Biological Applications* 80:38–4. doi:10.1016/j.msec.2017.05.130.
- Dimkpa, C. O., J. E. McLean, D. E. Latta, E. Manangón, D. W. Britt, W. P. Johnson, M. L. Boyanov, and J. A. Anderson. 2012. "CuO and ZnO Nanoparticles: Phytotoxicity, Metal Speciation, and Induction of Oxidative Stress in Sand-grown Wheat." *Journal of Nanoparticle Research* 14:1125. doi:10.1007/s11051-012-1125-9.
- Elavarthi, S., and B. Martin. 2010. "Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants." *Methods in Molecular Biology* 639:273–80. doi:10.1007/978-1-60761-702-0_16.
- Elizabeth, A., V. Bahadur, P. Misra, V. M. Prasad, and T. Thomas. 2017. "Effect of Different Concentrations of Iron Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Yield of Carrot (*Daucus carota* L.)." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6 (4):1266–9.
- El-Kereti, M. A., S. A. El-Feky, M. S. Khater, Y. A. Osman, and S. A. El-Sherbini. 2013. "ZnO Nanofertilizer and He Ne Laser Irradiation for Promoting Growth and Yield of Sweet Basil Plant." *Recent Patents on Food Nutrition & Agriculture* 5 (3):169–81. doi:10.2174/2212798405666131112142517.
- Ghosh, M., A. Jana, S. Sinha, M. Jothiramajayam, A. Nag, A. Chakraborty, A. Mukherjee, and A. Mukherjee. 2016. "The Effect of ZnO Nanoparticles in Plants: Cytotoxicity, Deregulation of Antioxidant Defenses, and Cell-cycle Arrest." *Mutation Research* 807:25–32. doi:10.1016/j.mrgentox.2016.07.006.
- Golak, I. B., and T. C. Taranath. 2015. "Seed Germination and Growth Responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. Exposed to Zinc and Zinc Nanoparticles." *International Journal of Environmental Sciences* 5 (4):840–7. doi:10.6088/ijes.2014050100078.
- Grillo, R., P. C. Abhilash, and L. F. Fraceto. 2016. "Nanotechnology Applied to Bio-encapsulation of Pesticides." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16 (1):1231–4. doi:10.1016/j.jnfs.2003.10.005.
- Hao, Y., X. Cao, C. Ma, Z. Zhang, N. Zhao, A. Ali, T. Hou, et al. 2017. "Potential Applications and Antifungal Activities of Engineered Nanomaterials against Gray Mold Disease Agent *Botrytis cinerea* on Rose Petals." *Frontiers in Plant Science* 8:1332. doi:10.3389/fpls.2017.01332.
- Hao, Y., Z. Zhang, Y. Rui, J. Ren, T. Hou, S. Wu, M. Rui, F. Jiang, and L. Liu. 2016. "Effect of Different Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth in Rice." 2nd Annual International Conference on Advanced Material Engineering (AME 2016), 166–73.
- Hatami, M., M. Ghorbanpour, and H. Salehjarjomand. 2014. "Nano-anatase TiO₂ Modulates the Germination Behavior and Seedling Vigority of Some Commercially Important

- Medicinal and Aromatic Plants." *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 8 (22): 53–9.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. "International Rules for Seed Testing." 242 p. By Michael Muschick, Zürichstrasse 50 P.O. Box 308 8000 Basersdorf CH, Switzerland.
- Jannohammadi, M., and N. Sabaghnia. 2012. "Effect of Pre-sowing Seed Treatments with Silicon Nanoparticles on Germinability of Sunflower (*Helianthus annuus*)." *Botanica Lithuanica* 21 (1):13–21. doi:10.1515/botlit-2015-0002.
- Krishna, K., and N. Natarajan. 2014. "Customizing Zinc Oxide, Silver and Titanium Dioxide Nanoparticles for Enhancing Groundnut Seed Quality." *Indian Journal of Science and Technology* 7 (9):1376–81. doi:10.1515/botlit-2015-0002.
- Kwak, S. S., K. Seo-Kyung, I. Moon-Soon, J. Kyung-Hee, P. Ji-Hyun, and I. Jang-Ryeol. 1995. "Acidic Peroxidase from Suspension-cultures of Sweet Potato." *Phytochemistry* 39 (5):981–4. doi:10.1016/0031-9422(95)00098-E.
- Lin, D., and B. Xing. 2007. "Phytotoxicity of Nanoparticles: Inhibition of Seed Germination and Root Growth." *Environmental Pollution* 150 (2):243–50. doi:10.1016/j.envpol.2007.01.016.
- Liu, R., and R. Lal. 2015. "Potentials of Engineered Nanoparticles as Fertilizers for Increasing Agronomic Productions." *Science of the Total Environment* 514:131–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.01.104.
- López-Moreno, M. L., G. De la Rosa, J. A. Hernandez-Viezas, H. Castillo-Michel, C. E. Botez, J. R. Peralta-Videa, and J. I. Garcia-Torresley. 2010. "Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CuO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants." *Environmental Science & Technology* 44 (16):7315–20. doi:10.1021/es903851g.
- Manle, A., L. Wang, and Y. Rajanlal. 2013. "Mechanism of Nanoparticle-induced Oxidative Stress and Toxicity." *DiMed Research International* 2013:1–15. doi:10.1155/2013/942916.
- Nakano, Y., and K. Asada. 1981. "Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts." *Plant and Cell Physiology* 22 (5):667–80. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- Narendhran, S., P. Rajiv, and R. Sivara. 2016. "Toxicity of ZnO Nanoparticles on Germinating *Sesamum indicum* (Co-1) and Their Antibacterial Activity." *Bulletin of Materials Science* 39 (7):415–21. doi:10.1007/s12034-016-1172-4.
- Pandey, A. C., S. S. Sanjay, and R. S. Yadav. 2010. "Application of ZnO Nanoparticles in Influencing the Growth Rate of *Cicer arietinum*." *Journal of Experimental Nanoscience* 5 (6): 485–97. doi:10.1080/17448081003645648.
- Prakash, M. G., and I. M. Chung. 2016. "Determination of Zinc Oxide Nanoparticles Toxicity in Root Growth in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings." *Acta Biologica Hungarica* 67 (5):289–96. doi:10.1556/0184.2016.3.6.
- Prasad, T. N. V. K. V., P. Sudhakar, Y. Sreenivasulu, P. Latha, V. MunaSwamy, K. R. Reddy, T. S. Sreepasad, P. R. Sajankal, and T. Pradeep. 2012. "Effect of Nanoscale Zinc Oxide Particles on the Germination, Growth and Yield of Peasut." *Journal of Plant Nutrition* 35 (6):905–27. doi:10.1080/01904167.2012.663443.
- Priester, J. H., Y. Ge, R. F. Mielke, A. M. Hurd, S. C. Moritz, K. Espinosa, J. Gelb, et al. 2012. "Soybean Susceptibility to Manufactured Nanomaterials with Evidence for Food Quality and Soil Fertility Interruption." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (37): E2451–6. doi:10.1073/pnas.1205421109.
- Qadus, A. M. S. 2015. "Mechanism of Nanosilicon-Mediated Alleviation of Salinity Stress in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Plants." *American Journal of Experimental Agriculture* 7 (2):78–85. doi:10.9734/AJEA/2015/15110.
- Rameshraddy, G., J. Pivithra, S. Madesh, K. N. Geetha, and A. G. Shankar. 2017. "Seed Priming and Foliar Spray with Nano Zinc Improves Stress Adaptability and Seed Zinc Content without Compromising Seed Yield in Ragi (Finger millet)." *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 5 (3):251–8. doi:10.18782/2320-7051.2906.

- Raskar, S. V., and S. L. Laware. 2014. "Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Cytology and Seed Germination in Onion." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (2):467-73.
- Rawat, P. S., R. Kumar, P. Ram, and P. Pandey. 2018. "Effect of Nanoparticles on Wheat Seed Germination and Seedling Growth." *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering* 12 (1):13-6. doi 10.19999/1307-6892/80641.
- Razzaq, A., R. Ammara, H. M. Jhazab, T. Mhamood, A. Hafeez, and S. Hussain. 2015. "A Novel Nanomaterial to Enhance Growth and Yield of Wheat." *Journal of Nanoscience and Technology* 2 (1):55-8.
- Servin, A., W. Elmer, A. Mukherjee, R. De la Torre-Roche, H. Hamdi, J. C. White, and C. Dimkpa. 2015. "A Review of the Use of Engineered Nanomaterials to Suppress Plant Disease and Enhance Crop Yield." *Journal of Nanoparticle Research* 17 (2):92. doi: 10.1007/s11051-015-2907-7.
- Sharma, P., D. Bhatt, M. G. Zaidi, P. P. Saradhi, P. K. Khanna, and S. Arora. 2012. "Silver Nanoparticle-mediated Enhancement in Growth and Antioxidant Status of *Brassica juncea*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167 (8):2225-33. doi:10.1007/s12010-012-9759-8.
- Siddiqui, M. H., M. H. Al-Whaibi, M. Firoz, and M. Y. Al-Khaishany. 2015. "Role of Nanoparticles in Plants". In *Nanotechnology and Plant Sciences*, edited by Manzer H. Siddiqui, Mohamed H. Al-Whaibi, and Firoz Mohammad, 19-35. Heidelberg: Springer International Publishing 305. doi: 10.1007/978-3-319-14502-0.
- Singh, A., N. B. Singh, I. Hussain, H. Singh, and V. Yadav. 2017. "Synthesis and Characterization of Copper Oxide Nanoparticles and Its Impact on Germination of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek." *Tropical Plant Research* 4 (2):246-53. doi:10.22271/tpr.2017.v4.i2.034.
- Venkatachalam, P., Priyanka, N. K. Manikandan, I. Ganeshbabu, P. Indiraarulsevi, N. Geetha, K. Muralikrishna, R. C., et al. 2017. "Enhanced Plant Growth Promoting Role of Phycomolecules Coated Zinc Oxide Nanoparticles with P Supplementation in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)." *Plant Physiology and Biochemistry* 110:118-7. doi:10.1016/j.plaphy.2016.09.004.
- Zafar, H., A. Alli, J. S. Ali, I. U. Haq, and M. Zia. 2016. "Effect of ZnO Nanoparticles on *Brassica nigra* Seedlings and Stem Explants: Growth Dynamics and Antioxidative Response." *Frontiers in Plant Science* 7:535. doi 10.3389/fpls.2016.00535.

Apéndice II

Artículos publicados



agronomy



Article

Zinc Oxide Nanoparticles Boosts Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Capsicum annum* L. during Germination

Josué I. García-López ¹, Francisco Zavala-García ¹, Emilio Olivares-Sáenz ¹, Ricardo H. Lira-Saldivar ², Enrique Díaz Barriga-Castro ², Norma A. Ruiz-Tones ³, Edith Ramos-Cortez ⁴, Rigoberto Vázquez-Alvarado ¹ and Guillermo Niño-Medina ^{1,*} 

¹ Laboratorio de Química y Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Nuevo León 66050, Mexico; j.lopez90@gmail.com (J.I.G.-L.); francisco.zavala-garcia@gmail.com (F.Z.-G.); emolivares@gmail.com (E.O.-S.); r.vazquez_alvarado@yahoo.com.mx (R.V.-A.)

² Agroplasticulture Department, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coahuila 25294, Mexico; hugo.lira@ciqa.edu.mx (R.H.L.-S.); enrique.diazbarriga@ciqa.edu.mx (E.D.B.-C.)

³ Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila 25115, Mexico; n.nrao@hotmail.com

⁴ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66451, Mexico; qfb.edith.rcz@gmail.com

* Correspondence: guillermo.ninomedina@uanl.edu.mx; Tel.: +52-811-340-4399

Received: 9 August 2018; Accepted: 26 September 2018; Published: 3 October 2018



Abstract: The effects of zinc oxide nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Capsicum annum* L. were determined in this research. Total phenols content, total flavonoids, and condensed tannins, as well as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioxidant capacity was determined. Results indicated that treatment with zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) improved seed germination rate during the first seven days. The seed vigor germination increased 123.50%, 129.40% and 94.17% by treatment with ZnO-NPs suspensions at 100, 200 and 500 ppm, respectively. The morphological parameters tested revealed that ZnO-NPs treatments did not significantly affect plumule development, but they had a significant impact ($p < 0.01$) on radicle length. Suspensions at 100, 200 and 500 ppm of ZnO-NPs inhibited seedling radicle growth and promoted accumulation of phenolic compounds, with a phytotoxic effect in this organ. Results suggested that zinc oxide nanoparticles influence seed vigor and seedling development and promoted the accumulation of desirable phenolic compounds in the radicle.

Keywords: ZnO nanoparticles; total phenols; total flavonoids; condensed tannins; growth; pepper

1. Introduction

Nanotechnology has drawn the attention of researchers in recent years. The term “nanotechnology” may be defined as the design, synthesis, manipulation and application of atomic or molecular aggregates with a dimension between 1 and 100 nm [1]. The engineering methodology and processing that produce metallic nanoparticles (NPs) alter their physical and chemical properties, as well as their reactivity, due to its small size and high surface volume ratio [2]. This new nanomaterial technology has been applied to modern and sustainable agriculture practices as innovative synthetic pesticides and potential fertilizers in the new green revolution [3].

dioxide (TiO₂) for agricultural uses has created potential nanofertilizers [4]. Since ZnO plays a vital role in physiological and anatomical responses, zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are mostly used in agricultural applications [5]. ZnO participates in regulation of hormone metabolism: it modifies auxin levels through tryptophan biosynthesis, and it is essential for activation of several enzymes, such as superoxide dismutase and dehydrogenases [6]. ZnO-NPs could potentially be applied as bacteriostatic agents to control the spread and infection of pathogens [7], as well as to enhance seed germination, seedling vigor index, plumule and radicle length [8]. In recent years, the seeds germination promoting action of ZnO-NPs employing various plant species have been confirmed [9]. However, some authors have reported phytotoxic effects of ZnO-NPs [10].

Phytotoxicity is a main concern in the application of nanomaterials during seed germination and seedling growth [11], because of seed germination is particularly sensitive to stress conditions. Application of ZnO-NPs as nanofertilizers can produce toxic changes in biological activity related to metal-based NPs, such as production of reactive oxygen species (ROS) [12]. NPs induce oxidative stress in tissues, which may trigger their metabolism and result in increased production of secondary metabolites and improved antioxidant activity [13]. These phytochemicals are responsible of the neutralization of toxic free radicals and prevention of excessive oxidation reactions [14]. However, the phytotoxicity mechanism of ZnO-NPs during germination and seedling growth has not been established [15].

Recent tests on seed germination and growth of plants treated with different NPs types and concentrations have shown their possible short-term phytotoxicity [16]. However, no studies has specifically addressed the effects of ZnO-NPs on the biosynthesis of different types of secondary metabolites and their biological effect on seed germination and early growth of *Capsicum annuum* L. seedlings. Thus, this research employed *Capsicum annuum* L. as a model to define the effects of ZnO-NPs on seed germination, seedling growth, biosynthesis of phenolic compounds (total phenols, flavonoids, and condensed tannins), and DPPH antioxidant capacity of extracts from seedlings exposed to ZnO-NPs.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The *Capsicum annuum* L. variety employed in this research was San Luis (Hydro Environment, Tlalpan, Mexico). This variety produces large fruits (12 to 15 cm long on average). The plant is very vigorous, and its canopy provides excellent coverage. The harvest is semi-concentrated and uniform, and it is recommended for fresh market consumption and dehydration processing.

2.2. Characterization of ZnO-NPs

ZnO-NPs were purchased from Nanostructured and Amorphous Materials Inc. (Houston, TX, USA). NPs were characterized morphologically and structurally by transmission electron microscopy (TEM), high resolution transmission electron microscopy (HRTEM) and selected area diffraction (SAED) using a FEI-TITAN 80-300 kV microscope operated at a 300 kV acceleration voltage (FEI-TITAN 80-300 kV, Fisher Scientific, Hillsboro, OR, USA). TEM and HRTEM micrographs were processed by Fast Fourier transformation software (Digital Micrograph 3.7.0, Gatan Software, Pleasanton, CA, USA).

2.3. Treatments

ZnO-NP suspensions were prepared at 100, 200 and 500 ppm based on the studies carried out by Sheteiwy et al. [17] and Salah et al. [18]. To ensure uniform dispersion, all suspensions were sonicated with a Q500 sonicator (Qsonica Newtown, CT, USA) for 25 min at 120 volts-3 amps, and 50 to 60 Ghz. Preparation process of the suspensions with ZnO-NPs was carried out based on a methodology already established by Reddy et al. [19].

2.4. Seed Germination and Seedling Growth

Seeds were counted in lots of 100 per treatment, and placed in a Petri dish (15 cm × 20 cm), above two layers of filter paper (Whatman, 90 mm diameter) using tweezers. Four treatments were applied as ZnO-NPs suspensions, 0 ppm (T1) (control, treated with distilled water), 100 ppm (T2), 200 ppm (T3), 500 ppm (T4). Ten milliliters of each ZnO-NPs suspension treatment were taken with a pipette (Pipetman Classic 1–10 mL) and added to the seeds for imbibition. The Petri dishes were then placed for 72 h in a growth chamber (Equitac model EGCS 35, 301 35HR, Equitac Guadalajara, Mexico) at $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ under a 16 h/8 h light:dark photoperiod.

Once the seed imbibition period was completed, four replications of 25 seeds were planted per replication for each treatment on a sheet of Anchor paper (Seedburo Equipment Company, Des Plaines, IL, USA). The paper was moistened with distilled water, and the seeds placed horizontally on the paper, ensuring that the embryo was oriented downwards. Then another sheet of paper was moistened to cover the seeds. Subsequently, the sheets were folded into a roll, about 4 cm wide. Once rolled, the sheets were placed in polyethylene terephthalate baskets (20 cm × 45 cm). The baskets were placed back into an EGCS 301 test chamber (Equitac, Madrid, Spain) at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and 75% relative humidity for 14 days.

The bioassay followed the International Seed Testing Association (ISTA) protocols [20], with some modifications. Germination vigor (V%) was calculated as percentage of normal seedlings from the total number. Germination rate (GR%) was determined as percentage of germinated seeds from the total seed number. Both variables were recorded at 7 and 14 days after sowing. A normal seedling was considered when it had at least a 2.0 cm radicle and plumule length. Plumule length was measured from the radicle-hypocotyl intersection to the base of the cotyledon, while radicle length was measured from the base of the hypocotyl to the apex of the radicle. Dry biomass weight per replication was determined 14 days after planting with an analytical balance and expressed in mg seedling^{-1} according to Corral-Díaz et al. [21].

2.5. Extraction of Free Phenolic Compounds

Dry biomass accumulation was used to quantify phenolic compounds and to measure the antioxidant activity according to Lopez-Contreras et al. [22]. Dry plumule and radicle tissues were milled and sieved to obtain a particle size $\leq 0.5 \text{ mm}$ (mesh 35). One hundred milligrams of sample were homogenized with 3 mL of 80% methanol in a screw cap culture tube, and stirred for 1 h at 200 rpm. After that, samples were centrifuged at $4500 \times g$, supernatants were recovered and stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ until they were used for phenolics and antioxidant capacity analysis.

2.6. Total Phenols Content

For this procedure, 0.2 mL of the extract were taken, and 2.6 mL of distilled water and 0.2 mL of Folin-Ciocalteu reagent were added. After 5 min, 2 mL of 7% Na_2CO_3 were added and the solution stirred for 30 s. The solution was placed in the dark for 90 min, and the absorbance at 750 nm was measured. Total phenols content was reported in milligrams of gallic acid equivalent per kilogram of sample (mgGAE kg^{-1}), calculated from gallic acid calibration curve from 0 to 200 mg L^{-1} .

2.7. Total Flavonoid Content

Determination of total flavonoid content was based on the reaction of the $\text{AlCl}_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ complex, where 0.2 mL of the extract were taken, and 3.5 mL of distilled water were added. Then 0.15 mL of 5% NaNO_2 , 0.15 of 10% AlCl_3 and 1 mL of 1 M NaOH were added too, at 5 min intervals each. The reaction was left for 15 min and after that, the absorbance at 510 nm was measured. Total flavonoid content was reported in milligrams of catechin equivalent per kilogram of sample (mgCatE kg^{-1}), calculated from catechin calibration curve from 0 to 200 mg L^{-1} .

2.8. Condensed Tannins Content

Condensed tannins content was determined by the vanillin- H_2SO_4 complex reaction. From the extract, 0.25 mL were taken and 0.65 mL of 1% vanillin were added; afterwards, 0.65 mL of 25% H_2SO_4 were added (vanillin and H_2SO_4 were dissolved in methanol). The reaction was carried out for 15 min at 30 °C, and the absorbance at 500 nm was measured. Condensed tannins content was reported in milligrams of catechin equivalent per kilogram of sample (mgCatE kg^{-1}), calculated from catechin calibration curve from 0 to 200 mg L^{-1} .

2.9. Determination of DPPH Antioxidant Capacity

Antioxidant capacity was measured by reduction of the absorbance of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical in the presence of the extract. A 60 μM DPPH working solution was prepared in 80% methanol and its absorbance was 0.95 at 517 nm. The samples were tested by mixing 0.5 mL of the extract with 1.5 mL of the DPPH working solution. The reaction was allowed to continue for 30 min and its absorbance reading taken. Antioxidant capacity was reported in millimol of Trolox equivalent per kilogram of sample (mmolTE kg^{-1}), based on previously built calibration curve with Trolox at concentrations from 0 to 500 mmol L^{-1} .

2.10. Statistical Analysis

The experiment was setup using a completely randomized design with four treatments and four replications. The general linear model was $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$; where Y_{ij} = the response variable; μ = general mean; α_i = effect of ZnO-NPs concentrations; ϵ_{ij} = experimental error. The experimental unit was a roll (folded Anchor paper) with 25 seeds. Results were reported as mean \pm standard deviation of four samples. The statistically significant difference between samples was analyzed with a one-way ANOVA and treatment means were compared with a Tukey Test ($p \leq 0.05$) using SPSS statistical package version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Characterization of ZnO-NPs

Figure 1a shows a typical TEM image for a ZnO-NPs sample. The morphology of NPs is quasi-spherical, as the micrograph shows. These NPs appear well dispersed within the TEM grid. Figure 1b shows a characteristic HRTEM image of a nanoparticle. In this image, lattice stripes are clearly observed with a spacing of 2.81 Å, that correspond to the lattice planes of a hexagonal zinc oxide structure. Figure 1c shows the size distribution of the NPs calculated from more than 300 particles.

Most of the particles in this sample (~75%) have diameters between 12 and 24 nm, and ~30% are larger than 12 nm and smaller than 20 nm. Figure 1d shows a common SAED pattern of ZnO sample. This pattern shows irregular rings associated with planes (100), (002), (102) and (110) of the crystal structure of zinc oxide. The SAED pattern was associated to a crystalline phase of zinc oxide.

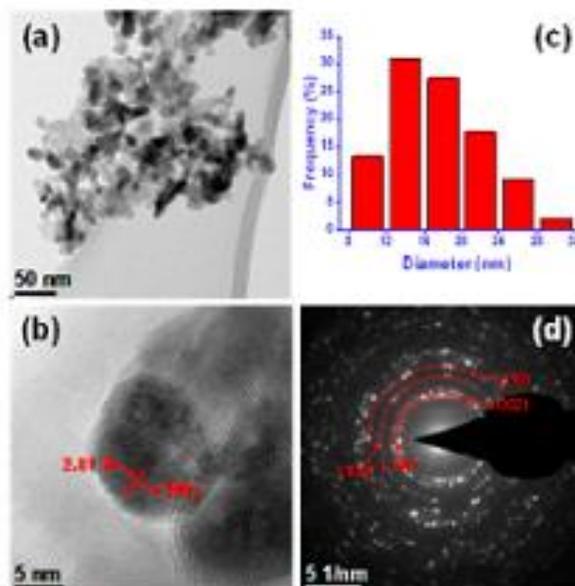


Figure 1. The micrographs show a zinc oxide nanoparticles (ZnO NP) sample. (a) Typical transmission electron microscopy (TEM) image of a nanoparticle; (b) Typical high resolution transmission electron microscopy (HRTEM) micrograph of a nanoparticle; (c) Size distribution of NPs (d) Typical selected area diffraction (SAED) pattern obtained for the area observed in panel (a).

3.2. Effect of ZnO-NPs on Germination and Vigor

The Figure 2B shows that germination percentage had no significant statistical differences ($p \leq 0.05$). However, germination vigor on the seventh day showed significant effects ($p \leq 0.05$): vigor at 100 and 200 ppm was 50.66% and 52.00%, respectively (Figure 2A). These values increased over the control treatment (0 ppm) by 123.5% and 129.4%, respectively. At a 500-ppm concentration, the germination vigor decreased by 15.4% in comparison to the highest performing treatment (200 ppm). These results indicate that ZnO-NPs application at 100 ppm and 200 ppm increase the emergence speed of the plumule and radicle during the first seven days. However, this response depends on concentration, but at 500 ppm of ZnO-NPs a decrease in the vigor was observed.

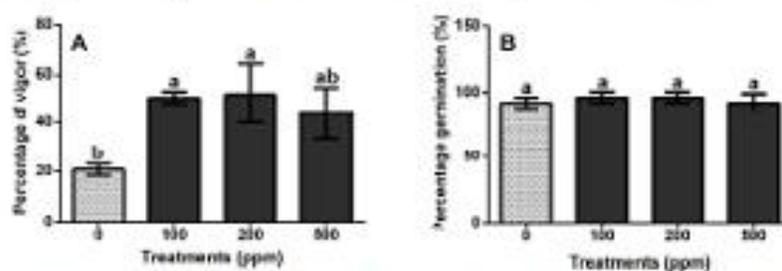


Figure 2. Vigor (A) and germination (B) percentages in *Capsicum annuum* L. seeds treated with ZnO-zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) at different concentrations (0, 100, 200 and 500 ppm). The bars represent the mean ($n = 4$) \pm standard deviation. Different letters are statistically different (Tukey $p \leq 0.05$) and represent the differences between treatments.

3.3. Effect of ZnO-NPs on Seedling Growth

The Table 1 shows the effect of ZnO-NPs on variables associated to seedling growth. Plumule length was not significantly affected ($p < 0.724$). However, radicle length responded significantly ($p < 0.01$) to ZnO-NPs doses: as the concentration increased, radicle length decreased by 50.0% (100 ppm), 53.9% (200 ppm) and 54.5% (500 ppm). The same trend was observed for dry biomass weight. Even though the treatments were statistically similar ($p < 0.155$), dry biomass accumulation gradually decreased from 100 to 500 ppm (Table 1). The 500 ppm treatment caused the highest biomass reduction with 8.5% to the control treatment (0 ppm). This result indicates that radicle growth is highly affected by ZnO-NPs treatments (Figure 3).

Table 1. Effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on plumule and radicle length, and fresh seedling weight of *Capsicum annuum* L.

Treatments (ppm)	Plumule Length (cm)	Radicle Length (cm)	Dry Seedling Biomass (mg Seedling ⁻¹)
0	3.29 ± 0.37 ^a	11.32 ± 2.48 ^a	45.73 ± 3.79 ^a
100	3.65 ± 0.30 ^a	5.66 ± 1.40 ^b	44.13 ± 0.88 ^a
200	3.46 ± 0.39 ^a	5.22 ± 1.65 ^b	42.87 ± 4.57 ^a
500	3.41 ± 0.30 ^a	5.15 ± 1.47 ^b	41.84 ± 5.02 ^a

Values are the average of four replications. Means (n = 4) ± standard deviation. Different letters are statistically different (Tukey, $p < 0.05$) and represent the differences between treatments.

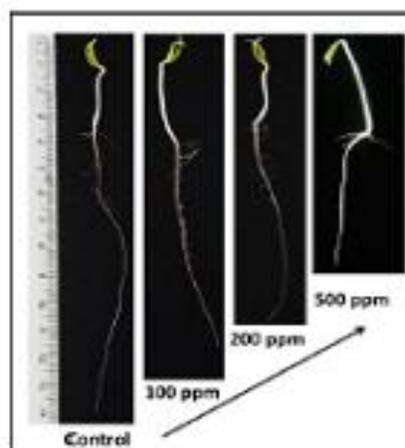


Figure 3. Effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on growth of *Capsicum annuum* L. seedlings. Each seedling represented an experimental unit.

3.4. Effect of ZnO-NPs on Phenolic Compounds Content and DPPH Antioxidant Activity

The results indicate that the phenolic compounds content in the plumule were not affected by the application of ZnO-NP to the seeds (Figure 4). On the contrary, there was a significant effect ($p < 0.01$) in the accumulation of phenolic compounds in the radicle since the increase of ZnO-NPs from 100 to 500 ppm, stimulated the accumulation of total phenols from 350.84 ± 23.99 (100 ppm), 493.80 ± 2.86 (200 ppm) and 539.11 ± 159.70 mgGAE kg⁻¹ (500 ppm) (Figure 4A), exceeding the accumulation in the control treatment (0 ppm) in 148.5%, 249.9% and 282%, respectively.

This behavior was also observed for the content of total flavonoids and condensed tannins (Figure 4B,C), in radicles exposed to ZnO-NPs. Plants treated with 500 ppm ZnO-NP accumulated the

highest concentration of total flavonoids and condensed tannins with $331.84 \pm 25.34 \text{ mg CatE kg}^{-1}$ and $191.95 \pm 2.86 \text{ mg CatE kg}^{-1}$, respectively, and exceeded for 164.4% and 627.7% the control treatment.

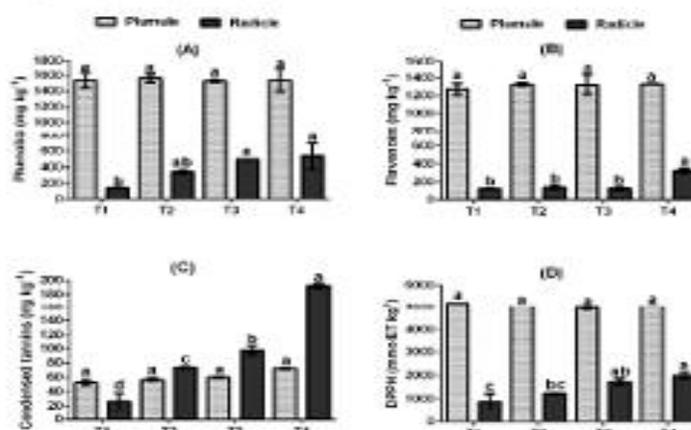


Figure 4. Phenolic content in *Capsicum annuum* L. seedlings treated with ZnO NPs. (A) Total phenols, (B) Flavonoids, (C) Condensed tannins (D) Antioxidant capacity (DPPH) (millimole equivalents of Trolox per kilogram of sample (mmol ET kg⁻¹). Values are the average of four repetitions. Means ($n = 4$), bars represent the standard deviation of the mean; Different letters are statistically different (Tukey, $p < 0.05$) and represent the differences between treatments.

Figure 4D shows the results for the antioxidant capacity determined by the DPPH method. The DPPH antioxidant capacity values were $4932 \pm 73.85 \text{ mmol ET kg}^{-1}$ to 5231 ± 15.23 in plumule and there were not statistical differences among treatments. On the other hand, the antioxidant capacity of the extracts from the radicle showed significant differences ($p \leq 0.01$). The higher values were found in the 500 ppm of ZnO-NPs treatment, with $2002.14 \pm 127.88 \text{ mmol TE kg}^{-1}$, and this treatment was 129.1% higher than the control treatment (0 ppm). This behavior is similar to the one observed with total phenolic compounds in the radicle; the highest concentration was obtained with the 500 ppm ZnO-NPs treatment.

4. Discussion

Increased emergence rate of shoots is caused by an enlarged concentration of indole acetic acid (IAA), as a result of water and nano nutrients filling the space between a selective permeable membrane under the seed coat and the intracellular space in the parenchyma of the seed coat. In turn, these events may increase seed vigor in the first days of germination [23]. Additionally, the beneficial effects of ZnO-NPs during germination leads to hormone biosynthesis, especially auxins and gibberellins, that promotes the degradation of seed reserves and increased seed vigor [24]. The improvement of characteristics associated to physiological quality of the seed may be attributed to NPs inducement of photosensitization reactions and photo-generation of active oxygen such as superoxide and hydroxide anions. These reactions stimulate the ion penetration and promote water and oxygen imbibition, necessary for rapid germination [25]. Studies carried out in seeds and seedling of ragi (finger millet) showed the effects of ZnO-NPs as an improvement in vigor of 45.54% with treatments of 1000 ppm was reported, while at 1500 ppm a significant reduction of this parameter was observed [26]. Similar results were found in *Capsicum annuum* L. seeds exposed to 0.75 g of ZnO-NPs, increasing vigor index significantly (67%) [27]. In this study, concentrations of ZnO-NPs in a range of 100 to 500 ppm affected

negatively the root growth and also led to an increase in non-enzymatic antioxidant tests, total phenols, flavonoids and condensed tannins. The response and accumulation of these compounds in the root was depended on the concentration of ZnO-NPs. Similar results were reported applying ZnO-NPs to seeds of *Brassica nigra*, obtaining a negative effect in the root growth and resulted in an increase of 79% of DPPH radical scavenging activity and an increase in phenolic compounds was also obtained [9].

In potato plants, the application of ZnO-NPs increased the total phenolic compounds the increase was of 1%, 20% and 22%, respectively, at concentrations of 100, 300 and 500 ppm, respectively [28]. Similar results, in the concentration of phenolic compounds were detected in an extracellular medium which increased 127.5% and 22.1%, respectively, in *Arthrospira platensis* (cyanobacteria) and *Haematococcus pluvialis* (microalgae) after treatments with 100 mg L⁻¹ of TiO₂NP. The increases were associated with oxidative stress due to the production of hydrogen peroxide [29].

Although it has been demonstrated that the application of NPs ZnO affects the physiology and biochemistry of plants, there are still generalized debates and ambiguities regarding the effects on the secondary metabolism of the plant [15]. Mainly, the effect of NPs on the phenolic compounds, since these molecules play important roles in the yield and adaptation of the plant, in response to biotic and abiotic stresses [30]. Therefore, it is a priority to understand the integral functioning of the secondary metabolism of the plant, in response to the application of NPs as a possible generator of oxidative stress.

The effect of ZnO-NPs during germination and seedling growth has been reported previously; however, results report positive effects, as well as phytotoxic effects. Response variability is mainly due to NP nature, size, concentration and genotype of the evaluated species [31]. In the present study, application of ZnO-NPs affected radicle development. It must be mentioned that radicle growth index is widely used as an indicator of phytotoxicity, since it is a highly sensitive to stress conditions [32]. The radicle is the first structure of the seed embryo and is therefore the first tissue exposed to excessive concentrations of ZnO-NPs [12]. For this reason, the adverse effects observed were more evident in radicles than in shoots. This suggests that radicle elongation was more sensitive to ZnO-NPs toxicity than shoot elongation, the differential sensitivity might be explained by direct exposure of radicles to ZnO-NPs suspensions [33].

The variation in radicle growth could be caused by the presence of ZnO-NPs or dissolved zinc ions interfering with radicle biochemistry and physiology. This interference promotes variation in radicle length and dry biomass accumulation. Studies in radish, lettuce, cucumber and arabidopsis have mentioned inhibition and variation in radicle growth and are agree with our results [34–36].

This inhibition might be attributed to two main effects: (1) a chemical toxicity dependent on release of (toxic) ions, such as penetration of nano-size particles and dissolution of Zn²⁺ ions from ZnO; (2) stress or stimulus caused by the surface, size or shape of the particles [36]. Toxicity at high concentrations is in accordance to the Shelford's tolerance law. Reduction in radicle length and plant biomass might be a consequence of toxicity caused by nanoparticle absorption by the plant from the media and intra or intercellular accumulation [37].

Studies using ZnO-NPs reported phytotoxicity in germination of corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds [38]. The results indicated inhibition of radicle development by the presence of ZnO-NPs. Additionally, the potential toxicity of iron (Fe) NPs using three types particle sizes (1 to 20 nm) on germination of barley and flax was studied [39]. Iron NPs affected germination, but shoot growth was more sensitive to them. On the other hand, some seedlings subjected to high concentrations of CuO NPs suffered a reduction in relative growth rate, modified gene expression, and alter the generation of reactive oxygen species [40].

In this study, the results indicate that ZnO-NPs treatments affected only the morphology of the radicle, due to a phytotoxic effect that caused oxidative stress and resulted in a greater activation of secondary metabolism in this tissue [41]. The link between ROS and secondary signaling messengers that lead to transcriptional regulation of the secondary plant metabolism should be considered, as it plays a vital role in the plant response to NPs treatment [15].

Greater accumulation of secondary metabolites in the radicle, is the result of increased ion release from ZnO-NPs (Zn^{2+}), their rapid absorption and solubility during germination and accumulation on the radicle surface, and NPs entrance into the radicle cells that generate excessive ROS accumulation [42]. The effect of ZnO-NPs on radicles can be explained in two ways: (1) the role of zinc in biochemical process, and (2) the role of ROS [9]. Although zinc is an important element for many metabolic processes, at high concentration it interferes with the cell division and induces oxidative stress [43].

A common consequence of damaging ROS levels is damage to cellular macromolecules, including membrane lipids, which leads to cell death and decreases shoot growth [44]. Metallic NPs can also damage other macromolecules such as DNA and affect cell division [45]. In addition, it was affirmed before that nanoparticles trigger alterations in Ca^{2+} and ROS levels involved in cell signaling and complex morphological, physiological and biochemical modifications at the organism level [46].

Plants activate enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanisms to eliminate excess of ROS that mitigate the effects of oxidative stress caused by ZnO-NPs. Activation of secondary plant metabolism is the main defense mechanism, and synthesis of phenolic compounds is crucial [17]. Phenolic compounds play a prominent role in ROS detoxification and their concentration may vary significantly [47] and they also act as electron donors in detoxification mechanisms in organelle structures [48].

During the stress caused by heavy metals, phenolic compounds act as metal chelators and on the other hand, can directly remove molecular species of active oxygen, mainly due to their redox properties, which can play an important role in the absorption and neutralization of free radicals, the extinction of singlet and triplet oxygen or the decomposition of peroxides [49]. Therefore, increases in antioxidant activity of plants exposed to NPs, is mainly due to the increase in phenolic compounds, which are powerful scavengers of ROS and are also capable of inhibiting enzymes that produce free radicals [50]. However, its antioxidant action lies mainly in its chemical structure. The main classes of phenolic compounds are defined according to their carbon skeleton (phenolic rings and chemical groups attached to them) in phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans, being the first two the most common in nature. Several thousands of phenolic compounds have been identified in plants and although is almost impossible to know the nature of all the phenolics present in a single sample, it is desirable to know the main classes of phenolic compounds present in it [51]. These compounds have several functions in plants, one of the main ones is the improvement of the phenylpropanoid metabolism and the content of phenolic compounds depends on the different environmental factors and stress conditions [52]. For example, the synthesis of isoflavones and some other flavonoids is induced when plants are infected or injured, most of them have antimicrobial activity. On the contrary, the induction and biosynthesis of phenolic compounds is related to the stress caused by heavy metals, this may explain the discrepancy of our results, since the greatest accumulation occurred in the phenolic compounds [53].

General chelating ability of phenolic compounds is probably related to the high nucleophilic character of the aromatic rings rather than to specific chelating groups within the molecule [54]. However, when the cellular concentration of ROS increases due to biotic and abiotic stresses, the balance of antioxidant defense systems in plants can be inhibited or modulated to avoid the oxidative stress that causes lipid peroxidation [55], this explains the maximum accumulation of phenols, flavonoids and tannins in the radicles exposed to the highest concentration (500 ppem).

It has been reported that high concentrations of Zn can increase phenol content in all parts of the *Coriandrum sativum* L., including leaves and stems, but mainly in radicles [56]. Radicle serve as physical and chemical barriers to biotic and abiotic stressors and provide antioxidants to scavenge excessive ROS production [57]. These compounds might act in synergy, and that could explain the trends observed in phenolic compounds and antioxidant activities [58]. Similar patterns have been obtained for *Stevia rebaudiana* Bertoni [59], also for the antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. [60] and in the radicle of *Brassica nigra* [9]. Based on the above results, our study pioneers in the evaluation

of ZnO-NPs phytotoxicity in *Capsicum annuum* L. and it serves as guide to measure effects on early seedling growth.

5. Conclusions

This study reveals the effect of ZnO-NPs at different concentrations on germination, vigor and early growth of *Capsicum annuum* L. seedlings. All concentrations ZnO-NPs (100, 200 and 500 ppm) treatments, significantly inhibited the radicle development due to a phytotoxic effect and led to increased accumulation of phenolic compounds and antioxidant activity in the radicle. Changes induced by ZnO-NPs in the physiology and biochemistry of plants may bring production of desirable secondary metabolites. However, it is necessary to evaluate the effects of ZnO-NPs to understand the specific changes they cause in plants in future studies.

Author Contributions: G.N.-M. and J.I.G.-L. conceived and designed the experiments; J.I.G.-L. and E.R.-C. performed the experiments; G.N.-M., J.I.G.-L., E.Z.-G. and E.O.-S. analyzed data; G.N.-M., R.H.L.-S., E.D.B.-C., E.Z.-G., E.O.-S., R.V.-A. and N.A.R.-T. contributed reagents, materials, and analysis tools; G.N.-M. and J.I.G.-L. wrote original draft; N.A.R.-T. reviewed and edited draft; G.N.-M., R.H.L.-S. and J.I.G.-L. revised and approved proofread.

Funding: The Article Processing Charges was funded by Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP) through the call Gastos de Publicación Individuales.

Acknowledgments: J.I.G.-L. acknowledges the doctorate scholarship 306970 given by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). G.N.-M. acknowledges CONACYT the previous funding from the project 169635—Investigación Científica Básica. R.H.L.-S. acknowledges CONACYT the previous funding from the project 266—Fronteras de la Ciencia.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hajra, A.; Mondal, N.K. Effects of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germination, biochemical and morphoanatomical attributes of *Cicer arietinum* L. *Energy Ecol. Environ.* **2017**, *2*, 277–288. [[CrossRef](#)]
- Arasuya, S.; Bana, K.N. Silver-chitosan nanoparticles induced biochemical variations of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Bioatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *8*, 39–44. [[CrossRef](#)]
- Lara-Saldivar, R.H.; Méndez-Angiello, B.; Vera Reyes, I.; de los Santos-Villanval, G. Agronanotecnología: Una nueva herramienta para la agricultura moderna. [Agronanotechnology: A new tool for modern agriculture]. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* **2018**, in press.
- Liu, R.; Lal, R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic production. *Sci. Total Environ.* **2018**, *534*, 131–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Agarwal, H.; Kumar, S.V.; Rajesh Kumar, S. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles—An eco-friendly approach. *Resour. Effic. Technol.* **2017**, *3*, 406–413. [[CrossRef](#)]
- Narendhran, S.; Rajiv, P.; Sivaraj, R. Toxicity of ZnO nanoparticles on germinating *Sesamum indicum* (Co-1) and their antibacterial activity. *Bull. Mater. Sci.* **2016**, *39*, 415–421. [[CrossRef](#)]
- Raskat, S.V.; Lawate, S.L. Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, *3*, 467–473.
- Singh, A.; Singh, N.B.; Hussain, I.; Singh, H.; Yadav, V.; Singh, S.C. Green synthesis of nano zinc oxide and evaluation of its impact on germination and metabolic activity of *Solanum lycopersicum*. *J. Biotechnol.* **2016**, *233*, 84–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zafar, H.; Ali, A.; Ali, J.S.; Haq, I.U.; Zia, M. Effect of ZnO nanoparticles on *Trametes tigris* seedlings and stem explants: Growth dynamics and antioxidative response. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Burman, U.; Saini, M.; Kumar, P. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicol. Environ. Chem.* **2013**, *95*, 605–612. [[CrossRef](#)]
- Yang, Z.; Chen, J.; Dou, R.; Gao, X.; Mao, C.; Wang, L. Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 15100–15109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Xiang, L.; Zhao, H.M.; Li, Y.W.; Huang, X.P.; Wu, X.L.; Zhai, T.; Yuan, Y.; Cai, Q.Y.; Mo, C.H. Effects of the size and morphology of zinc oxide nanoparticles on the germination of Chinese cabbage seeds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *22*, 10452–10462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vedeřová, K.; Vebět, Z.; Dožkal, B.; Otašec, M.; Pompeians, A.; Triska, J.; Urban, O. Changes of primary and secondary metabolites in barley plants exposed to CdO nanoparticles. *Environ. Pollut.* **2016**, *218*, 207–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Franklin, G.; Conociçlo, L.E.; Kombrink, E.; Dias, A.C. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 60–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Marslin, G.; Shobba, C.J.; Franklin, G. Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Awasthi, A.; Bansal, S.; Jangir, L.K.; Awasthi, G.; Awasthi, K.K.; Awasthi, K. Effect of ZnO nanoparticles on germination of *Triticum aestivum* seeds. *Macromol. Symp.* **2017**, *376*, 1700043. [[CrossRef](#)]
17. Shetowry, M.; Fu, Y.; Hu, Q.; Nawaz, A.; Guan, Y.; Li, Z.; Huang, Y.; Hu, J. Seed priming with polyethylene glycol induces antioxidative defense and metabolic regulation of rice under nano-ZnO stress. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 19999–20002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Salah, S.M.; Guan, Y.J.; Cao, D.D.; Li, J.; Nawaz, A.; Hu, Q.J.; Hu, W.M.; Ning, M.Y.; Hu, J. Seed priming with polyethylene glycol regulating the physiological and molecular mechanism in rice (*Oryza sativa* L.) under nano-ZnO stress. *Sci. Rep.* **2015**, *30*, 14278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Reddy, V.L.; Adisa, I.O.; Rawat, S.; Kalagara, S.; Hernandez-Viecas, J.A.; Peralta-Videa, J.R.; Gardea-Torresdey, J.L. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *132*, 120–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. International Seed Testing Association (ISTA). *International Rules for Seed Testing*; International Seed Testing Association: Zurich, Switzerland, 2004; p. 243.
21. Corral-Diaz, B.; Peralta-Videa, J.R.; Alvarez-Parrilla, E.; Rodrigo-Garcia, J.; Morales, M.I.; Osuna-Avila, P.; Niu, G.; Hernandez-Viecas, J.A.; Gardea-Torresdey, J.L. Corium oxide nanoparticles alter the antioxidant capacity but do not impact tuber genome in *Raphanus sativus* (L.). *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *84*, 277–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. López-Contreras, J.J.; Zavala-García, E.; Urias-Orova, V.; Martínez-Avila, G.C.G.; Rojas, R.; Nino-Molina, G. Chromatic, phenolic and antioxidant properties of *Sorghum bicolor* genotypes. *Not. Bot. Horti Agrbot.* **2015**, *43*, 366–370.
23. Van Dongen, J.T.; Ammerlaan, A.M.H.; Woudacloud, M.; Van Aelst, A.C.; Bostlap, A.C. Structure of the developing pea seed coat and the post-photosyn transport pathway of nutrients. *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 729–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. El-Kewi, M.A.; El-Fely, S.A.; Khater, M.S.; Osman, Y.A.; El-sherbini, E.S.A. ZnO nanofertilizer and He Ne Laser irradiation for promoting growth and yield of sweet basil plant. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* **2013**, *5*, 169–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gokak, I.B.; Tarasath, T.C. Seed germination and growth responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. exposed to zinc and zinc nanoparticles. *Int. J. Environ. Sci.* **2018**, *5*, 840–847.
26. Rameshreddy, G.J.; Parithra, G.J.; Mahesh, S.; Geetha, K.N.; Shankar, A.G. Seed priming and foliar spray with nano-zinc improves stress adaptability and seed zinc content without compromising seed yield in ragi (Finger millet). *Int. J. Pure Appl. Biosci.* **2017**, *5*, 253–258.
27. Afreyeen, S.M.; Charutasia, A.K. Effect of zinc oxide nanoparticles on seed germination and seed vigour in chili (*Capsicum annum* L.). *Int. J. Pharmacol. Phytochem.* **2017**, *6*, 1564–1566.
28. Raigond, B.; Raigond, B.; Kaundal, B.; Singh, B.; Joshi, A.; Dutt, S. Effect of zinc nanoparticles on antioxidative system of potato plants. *J. Environ. Biol.* **2017**, *38*, 435–439. [[CrossRef](#)]
29. Comotto, M.; Casazza, A.A.; Akbarian, B.; Caratto, V.; Fenucci, M.; Poggio, P. Influence of TiO₂ nanoparticles on growth and phenolic compounds production in photosynthetic microorganisms. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Michalak, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ.* **2006**, *15*, 523–530.

31. Hatami, M.; Ghorbanpour, M.; Sakhebarfomand, H. Nano-anatase TiO₂ modulates the germination behavior and seedling vigour of some commercially important medicinal and aromatic plants. *J. Biol. Environ. Sci.* **2014**, *8*, 53–59.
32. Ali, S.; Shahbaz, M.; Shahzad, A.N.; Khan, H.A.; Anwar, M.; Haider, M.S.; Fatima, A. Impact of copper toxicity on stone-head cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) in hydroponics. *PeerJ* **2015**, *3*, e1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ma, Y.; Kuang, L.; Hu, X.; Bai, W.; Ding, Y.; Zhang, Z.; Zhao, Y.; Chai, Z. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere* **2010**, *78*, 273–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liu, D.; Xing, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* **2007**, *150*, 243–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lee, S.; Kim, S.; Kim, S.; Lee, I. Assessment of phytotoxicity of ZnONPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 848–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lee, C.W.; Mahendra, S.; Zedrow, K.; Li, D.; Tsai, Y.C.; Braam, J.; Alvarez, P.J. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, *29*, 669–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Liu, D.; Xing, B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 5580–5585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhang, R.; Zhang, H.; Tu, C.; Hu, X.; Li, L.; Luo, Y.; Christie, P. Phytotoxicity of ZnO nanoparticles and the released Zn (II) ion to corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) during germination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *22*, 11109–11117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. El-Tamoh, Y.S.; Jonez, E.J. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environ. Toxicol.* **2012**, *27*, 42–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wang, P.; Lombi, E.; Zhao, F.J.; Kopittke, P.M. Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21*, 699–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sewelam, N.; Kazan, K.; Schenk, P.M. Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the cross-road. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ebbs, S.D.; Bradfield, S.J.; Kumar, P.; White, J.C.; Musante, C.; Ma, X. Accumulation of zinc, copper, or cadmium in carrot (*Daucus carota*) exposed to metal oxide nanoparticles and metal ions. *Environ. Sci. Nutr.* **2016**, *3*, 114–126. [[CrossRef](#)]
43. Wang, B.; Feng, W.Y.; Wang, T.C.; Jia, G.; Wang, M.; Shi, J.W.; Zhang, F.; Zhao, Y.L.; Chai, Z.F. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol. Lett.* **2006**, *161*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Van Breusegem, F.; Dat, J.F. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 384–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rajeshwari, A.; Suresh, S.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. Toxicity evaluation of gold nanoparticles using an *Allium cepa* bioassay. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 24000–24009. [[CrossRef](#)]
46. Sosan, A.; Svistunenko, D.; Straltsova, D.; Tsirukina, K.; Smolich, I.; Lawson, T.; Subramaniam, S.; Golovko, V.; Anderson, D.; Sokolik, A.; et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* **2016**, *8*, 245–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Mahendra, S.; Zhu, H.; Cobrin, V.L.; Alvarez, P.J. Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 9424–9430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mittler, R. ROS are good. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 11–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bhum, G.; Rana, N.; Savithamma, N. Screening of zinc oxide nanoparticles for cell proliferation synthesized. *Int. J. Drug Del. Res.* **2014**, *6*, 0975–9344.
50. Doctero, V.H.; Diaz, C.; Terry, C.; Rojas, R. Phenolic compounds and antioxidant activity in vitro of 6 Peruvian plants. *Rev. Soc. Quim. Perú* **2013**, *79*, 13–20.
51. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S–2085S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Takahama, U.; Oritani, T. Flavonoid and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. *J. Plant Res.* **2000**, *113*, 301–309. [[CrossRef](#)]

53. Parry, A.D.; Tiller, S.A.; Edwards, R. The Effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 195–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moran, J.F.; Klucas, R.V.; Graye, R.J.; Abian, J.; Becana, M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 861–870. [[CrossRef](#)]
55. Sharma, P.; Bhatt, D.; Zaidi, M.G.; Saradhi, P.P.; Khanna, P.K.; Arora, S. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167*, 2225–2233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Marichali, A.; Dallali, S.; Ouenghemmi, S.; Sebei, H.; Hosni, K. Germination, morpho-physiological and biochemical responses of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to zinc excess. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *55*, 248–257. [[CrossRef](#)]
57. Ramakrishna, A.; Ravishankar, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* **2011**, *6*, 1720–1731. [[PubMed](#)]
58. Ghiassi-Tarzi, B.; Gharachorloo, M.; Baharinia, M.; Mortazavi, S.A. The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iran J. Pharm. Res.* **2012**, *11*, 1137–1143.
59. Javed, R.; Mohamed, A.; Yücesan, B.; Gürel, E.; Kasas, R.; Zia, M. CuO nanoparticles significantly influence in vitro culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2017**, *131*, 611–620. [[CrossRef](#)]
60. Ghorbanpour, M. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Ind. J. Plant Physiol.* **2015**, *20*, 249–256. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Apéndice III

Artículos publicados



Article

Foliar Application of Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate Boosts the Content of Bioactive Compounds in Habanero Peppers

Josué I. García-López ¹, Guillermo Niño-Medina ^{1*}, Emilio Olivares-Sáenz ¹, Ricardo H. Lira-Saldivar ², Enrique Díaz Barriga-Castro ², Rigoberto Vázquez-Alvarado ¹, Pablo A. Rodríguez-Salinas ¹ and Francisco Zavala-García ^{1*}

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Laboratorio de Química y Bioquímica, Facultad de Agronomía, Francisco Villa S/N, Col. Ex-Hacienda el Canadá, C.P. 66050 General Escobedo, Nuevo León, Mexico

² Departamento de Agroplasticultura, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), CP. 25294 Saltillo, Coahuila, Mexico

* Correspondence: guillermo.ninomedina@uanl.edu.mx (G.N.-M.); francisco.zavalag@uanl.mx (F.Z.-G.); Tel.: +52-81-1340-4399 (G.N.-M.)

Received: 22 June 2019; Accepted: 24 July 2019; Published: 30 July 2019

Abstract: The physiological responses of habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.) to foliar applications of zinc sulphate and zinc nano-fertilizer were evaluated in greenhouse trials. The effect of the supplement on fruit quality of habanero pepper was particularly observed. Habanero pepper plants were grown to maturity, and during the main stages of phenological development, they were treated with foliar applications of Zn at concentrations of 1000 and 2000 mg L⁻¹ in the form of zinc sulfate (ZnSO₄) and zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs). Additional Zn was not supplied to the control treatment plants. ZnO NPs at a concentration of 1000 mg L⁻¹ positively affected plant height, stem diameter, and chlorophyll content, and increased fruit yield and biomass accumulation compared to control and ZnSO₄ treatments. ZnO NPs at 2000 mg L⁻¹ negatively affected plant growth but significantly increased fruit quality, capsaicin content by 19.3%, dihydrocapsaicin by 10.9%, and Scoville Heat Units by 16.4%. In addition, at 2000 ZnO NPs mg L⁻¹ also increased content of total phenols and total flavonoids (soluble + bound) in fruits (14.50% and 26.9%, respectively), which resulted in higher antioxidant capacity in ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and FRAP (ferric reducing antioxidant power) (15.4%, 31.8%, and 20.5%, respectively). These results indicate that application of ZnO NPs could be employed in habanero pepper production to improve yield, quality, and nutraceutical properties of fruits.

Keywords: *Capsicum chinense*; nanofertilizers; capsaicenoide; physicochemical quality; phenolic compounds; antioxidant capacity

1. Introduction

The addition of fertilizers to supplement the natural fertility of the soil is essential for modern crop production, and precise nutrient management is indispensable for sustainable agricultural production [1]. Zinc (Zn) plays an important role in plant functions, it modifies auxin effects through regulation of tryptophan synthesis, and it acts as a cofactor in the redox enzymes like superoxide dismutase and dehydrogenases [2].

Micro-elements play important roles in plant development, fruit yield and quality [3,4]. Zinc is an essential micro-nutrient for humans, animals, and plants. Plants generally absorb Zn as a divalent cation

(Zn²⁺). Zinc is required in protein biosynthesis and carbohydrate metabolism, and plays an important role in gene expression related to environmental stress [5,6]. Although Zn is required by plants for optimal metabolism, the efficiency of this micro-element depends on its absorption and translocation [7]. Traditional agriculture practices employ Zn sulphate (ZnSO₄) or EDTA-Zn chelate for application to leaves and ground. However, the efficiency is low [8]. Zn absorption through the leaves seems to be determined by the source of the micro-nutrients. For example, in a study carried out by Doolotte et al. [9] on plants of *Triticum aestivum* cv Shield, when comparing foliar fertilization with ZnSO₄ and ZnEDTA at a concentration of 1000 mg L⁻¹, there was a significantly higher proportion of Zn on the leaves treated with ZnSO₄ compared to leaves treated with ZnEDTA. The foliar application of Zn is an effective way to boost the absorption of Zn in plants, however, the development of Zn-based foliar fertilizers is compromised by the lack of knowledge, development of new materials, mobility, and Zn speciation within the plant [9,10]. In Mexico, the habanero pepper is consumed mainly in the states of Yucatan, Quintana Roo, Campeche, and Tabasco, with a growing demand in the Mexican and international markets. However, current crop yields do not meet local demand, mainly due to limited technology in their production and adequate supply of fertilizers through the irrigation system [11]. Therefore, an optimized fertilization method that increases crop yield and reduces pollution by using more efficient fertilizers is needed. The use of Zn-based foliar fertilizers during the development of the crops can be an effective way to increase the assimilation of Zn and increase the yield, however, the soluble salts of Zn can cause damage to the leaf and its cost is very elevated [10]. While, the ZnO NPs are considered a biosecure material for biological species, since their efficiency has been demonstrated to promote the germination of seeds and the growth of plants, as well as in the suppression of disease and the protection of plants for their antimicrobial activity [12]. The concentration of Zn in the soil solution is very low and occurs in the form of various types of salts including ZnS, sphalerite (ZnFe)₂S, ZnO zincite and smithsonite ZnCO₃, however, the absorption of this element by plants is determined by the concentration of carbonates (CaCO₃) and soil pH, which are the main causes that limit the availability of this micronutrient [13]. As a consequence, there is a growing interest in foliar fertilization for sustainable crop management. Foliar fertilization solves limited nutrient availability by minimizing losses of fertilizer applied to the soil and that limit the delivery of nutrients to the organs of the plant during critical stages of growth [14].

Nanotechnology, with the use of nanoparticles (NPs), is providing novel approaches to plant nutrition [15]. Fertilizers at the nanometer scale (1–100 nm) increase greatly the points of impact because of their reduced size, which in turn could improve the interaction and uptake of micronutrients in crop fertilization [12]. Foliar applications of nano-fertilizers have proven to be effective because they supply nutrients to plants in a gradual and controlled manner compared to conventional fertilization [16,17]. Application of nano-fertilizers also requires smaller quantities than conventional fertilizers [1]. A study conducted by Rossi et al. [18] showed that foliar application of ZnO NPs positively influenced growth and physiology of coffee plants (*Coffea arabica* L.), even more than Zn (ZnSO₄) salts application, due to greater leaf penetration. Research using pomegranate trees (*Punica granatum* cv. Ardestani) showed that foliar fertilization with relatively low amounts of Zn and B nano-fertilizers modified yield and fruit quality, and juice sugars and maturity index increased [1]. Our research group has also observed positive effects of ZnO NPs on *Capsicum chinense* germination, that, in turn, positively affected physiological variables (seed germination, seedling vigor, and biomass accumulation) and nutraceutical properties (total phenols, total flavonoids, condensed tannins, and DPPH antioxidant capacity) [19].

The effects of ZnO NPs on plants result from changes in the physical, chemical, and biological characteristics of the materials applied as nano-fertilizers, as well as on their catalytic properties. These changes consequently affect chemical and biological activities that could induce oxidative stress and toxicity in plants and stimulate the antioxidant systems [20,21]. A recent study concluded that nano-toxicity depends on the composition and concentration of the NPs and the species evaluated [22].

Although, the effect of ZnO NPs has been reported in crops like onion (*Allium cepa* L.), green pea (*Pisum sativum* L.) and spinach (*Spinacia oleracea*) [23–25], no studies have been published describing

the interaction of ZnO NPs and ZnSO₄ in the habanero pepper. Thus, this research compared growth responses of pepper plants to foliar applications of zinc sulphate (ZnSO₄) and zinc nano-fertilizer (ZnO NPs), and analyzed the quality and accumulation of bioactive compounds of pepper fruits obtained from plants treated with ZnSO₄ and ZnO NPs to understand their effect on the physiology of pepper plants.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The *Capsicum chinense* variety used was Chichen Itza (Seminis, St. Louis, MO, USA, EE.UU.). It is a vigorous and early maturing plant that can be harvested up to two weeks earlier than other varieties. Fruits have three lobes and an attractive orange color. The fruits are characteristically spicy, 10,500 SHU units fresh and up to 200,000 SHU dry.

2.2. Characteristics of the ZnO NPs Used in This Experiment

The morphological and structural characterization of the ZnO NPs used in this study has been reported previously by García-López et al. [26]. Specifically, most of the particles (75%) had diameters of 12 to 24 nm, and 30% showed sizes greater than 12 nm and smaller than 20 nm.

2.3. Preparation of Suspensions

ZnSO₄ and ZnO NPs suspensions were prepared just prior to exposure in deionized water (DI) and homogenized with a probe sonicator (Qsonica, CT, USA) for 30 min at 120 volts, 3 amps and 50 to 60 GHz. Subsequently, pH for each suspension was adjusted to 6.5–6.7 with HCl and 0.1 N NaOH before exposure to the plant [27]. The treatments applied were: absolute control without Zn, 1000 mg L⁻¹ and 2000 mg L⁻¹ with ZnSO₄, 1000 mg L⁻¹ and 2000 mg L⁻¹ with ZnO NPs, with five repetitions for each treatment. The experimental unit was one plant per pot. The concentrations used were selected from previous studies conducted by Torabian et al. [28] and Kisan et al. [29]. Electrical conductivities (EC) of the suspensions with ZnSO₄ were 0.97 and 1.64 mS cm⁻¹ for 1000 and 2000 mg L⁻¹, while the CE of the suspensions with ZnO NPs were 0.68 and 1.11 mS cm⁻¹ for 1000 and 2000 mg L⁻¹, respectively. The plants of the control treatment were treated with distilled water with an EC of 0.37 mS cm⁻¹.

2.4. Foliar Exposure to Zn

Approximately 0.125 L of the Zn suspensions was sprayed to cover the foliage twice in each of the following stages of crop development: vegetative growth (VG) 45–89 days, flowering (FL) 90–140 days, fruit development (FG) 141–170 days, and maturity (M) 171–205 days, to give a total amount of 0.8 and 1.6 mg of zinc per plant. For foliar application, a 1.2 L hand Hudson RL Flomaster sprayer (Lowell, MI, USA) was used, it was equipped with a brass nozzle and a safety valve. Crop conditions are explained in the following section. In Figure 1, each of the phenological stages of the crop is shown in a representative manner, in addition to the foliar application of the treatments.



Figure 1. Schematic representation of each of the vegetative stages of the crop, additionally, a representative image of the way in which the treatments were applied is presented.

2.5. Growth of Habanero Pepper Plants and Greenhouse Conditions

Habanero pepper plants were established in an Israeli-type greenhouse equipped with semi-automatic side windows and zeniths covered with polyethylene. The experiment was carried out for 206 days after transplant. Average temperature was 22.1 °C at a relative humidity of 79%. Planting density was 2.4 plants per m². Pumicite was used as a growth medium in 19-L white plastic containers.

An automated drip-irrigation system watered eight times per day for a total of approximately 3.2 L of water per plant. The nutrient solution was based on Steiner [30] at pH of 6.5. During vegetative growth, the concentration was 25%, and it increased to 50% during flowering and fruit development [31]. Each pot was provided with equal amounts of nutrient solution. The nutrient solution did not contain Zn.

2.6. Performance Variables and Relative Chlorophyll Content

During the plant life cycle, physiological parameters such as plant height, stem diameter, and chlorophyll content were measured at 45, 90, 145, and 201 days. These dates coincide with vegetative growth, flowering, fruit development, and maturity, respectively. Relative chlorophyll content was determined in fresh plants, with a portable chlorophyll meter (SPAD-502, Minolta, Osaka, Japan). Data reported are averages of three measurements per leaf for each experimental unit [32].

At the end of the crop, the numbers of fruits harvested per plant, the average weight of fruits (g), the yield per plant (total weight of fruits g), and the fresh and dry weight of aerial biomass (g) were quantified. This data set was registered at 208 days to evaluate the growth and performance of habanero pepper plants. The dry weight of aerial biomass (g) was obtained after drying in a Lab-Line stove (Model 3478M, Iztapalapa, Mexico) at a constant temperature of 70 °C for a period of 72 h.

2.7. Preparation for the Analysis of Habanero Pepper Fruits

In this study, fruits were harvested 208 days after sowing, in the fully mature stage (orange color). Afterwards, they were washed with a 3% sodium hypochlorite solution and dried in a cool and ventilated place [33]. After drying, the effect of ZnSO₄ and ZnO NPs on fruit quality was evaluated on 10 uniform fruits without defects (physical or pathological damage) selected from each of the five replications per treatment [34]. A total of 50 fruits per treatment were sampled: 25 fruits were used for physical and chemical analysis, and the remaining 25 fruits were for functional analyses [35].

2.7.1. Physicochemical Fruit Evaluations

Chromatic evaluations were carried out on the fruit bark with a CR-10 Konica Minolta colorimeter (Tokyo, Japan). Chromatic parameters were obtained using the CIELAB (L*, a*, b*) and CIELCH (L*, C*, h) color systems according to the Commission Internationale De L'ecclairage (CIE) [36]. L* defines luminosity (0 black, 100 white), a* indicates red (positive a*) or green (negative a*), b* indicates yellow (positive b*) or blue (negative b*). C* (chrome, saturation level of h) and h (tone angle: 0° = red, 90° = yellow, 180° = green, 270° = blue). Color display was obtained using the ColorHexa [37] online software using the L*, a* and b* values.

Firmness and cutting force for the fruits was evaluated with an Ametek Chatillon DFS II strength meter adapted to a manual rotating system (West, Sussex, UK). Fruits were deformed a total distance of 2 mm with a 30 mm compression plate, the maximum force required was recorded in Newton (N). After physical evaluations, fruits were stored at -20 °C until chemical evaluations were performed.

The total soluble solids were determined by manually squeezing the juice of each fruit in a refractometer (Atago MASTER-M, Tokyo, Japan) with a scale of 0 to 33%. For the determination of titratable acidity (TA) and pH, fruits were cut into slices with a knife and placed inside a polyethylene bag to produce a homogeneous mixture. Then 5 g of sample were taken (pericarp and placenta without seed), 25 mL of water added, and the mixture processed for 40 s in an Oster blender (M4655-813/465-42, Sunbeam, Mexico City, Mexico). The extract was filtered through organza fabric. The pH

was measured using a bench-top meter (pH/ORP Meter HI 2221, Cd de México, México). Titratable acidity (TA) was determined using the Association of Official Analytical Chemist (AOAC) [38] method 942.15 with 0.1 M NaOH at pH 8.2 using phenolphthalein as indicator. Titratable acidity was reported in % of citric acid in fresh weight.

2.7.2. Sample Preparation for Capsaicinoids, Phenolics and Antioxidant Capacity Analysis

Habanero pepper fruits were sliced with a knife, and the seeds were removed to determine bioactive and functional compounds. Subsequently, fruits were placed in a polyethylene bag to make a homogeneous mixture, and samples were stored in an ultra-freezer (3003 Ultrafreezer Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.7.3. Capsaicinoids Extraction

Extraction and quantification of capsaicinoids were based on the method established by Ryu et al. [39]. Five grams of fresh pepper sample (pericarp and placenta without seed) were weighted, and 25 mL of acetone was added. The mixture was processed for 30 s in an Oster blender (M4655-813/465-42, Sunbeam, Mexico City, Mexico). The extract was heated to $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one hour in a laboratory oven (ON-12G, Jeio Tech, Seoul, Korea). After this period, samples were centrifuged at $4500\times g$ for 5 min, and the supernatant was recovered for analysis.

2.7.4. Quantification of Capsaicin and Dihydrocapsaicin by HPLC

For HPLC analysis, extracts with acetone were filtered with a 0.25 mm syringe filter with a pore size of $45\text{ }\mu\text{m}$, and $10\text{ }\mu\text{L}$ were injected directly into the system Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC, equipped with a 1260 G1311C quaternary pump, a G1316A thermostatted column compartment, a G1329B autosampler and a G4212B diode array detector (Santa Clara, CA, USA). The column used was a ZORBAX Eclipse Plus C-18 analytical column ($100\text{ mm} \times 3\text{ mm id}$, $5\text{ }\mu\text{m}$). The isocratic mobile phase included 100% acetonitrile (solvent A) and 1% acetic acid in water (solvent B) at a 40:60 ratio and a flow rate of $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, with a run time of 20 min. Absorbance was measured at 280 nm.

The quantification of capsaicin (8-methyl-N-vanillil-6-nonenamide) and dihydrocapsaicin (8-methyl-N-vanillinonamide) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was based on corresponding calibration curves at concentrations of 0, $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $160\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $240\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $320\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [39].

2.7.5. Scoville Heat Units Calculation

Capsaicinoid content ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was transformed into Scoville Heat Units (SHU) as established by Todd et al. [40]. Determinations of the pungency in SHU were made by multiplying the individual contents of capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) by the value corresponding to the intensity of the threshold.

$$[(\% \text{ Capsaicin} \times 16.1) + (\% \text{ Dihydrocapsaicin} \times 16.1)] \times 10,000 = \text{SHU} \quad (1)$$

2.8. Extraction of Soluble and Bound Phenolic Compounds

Soluble extracts were obtained by suspending 5 g of the fresh pepper sample (pericarp and placenta without seed) in 50 mL of 80% methanol. The sample was purged with an argon stream for 30 s and mixed for 45 s in an Oster blender (M4655-813/465-42, Sunbeam, Mexico City, Mexico). Finally, the mixture was filtered with organza fabric to separate the insoluble matter from the juice, and it was placed in 15 mL centrifuge tubes. The extract was centrifuged at $4500\times g$, and the supernatant was recovered and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Bound phenolics were extracted by suspending the remaining insoluble matter in 10 mL of $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH and purged with argon for 30 s. The mixture was then shaken at 200 rpm for 2 h. After that, the pH was adjusted to 2.5 with concentrated HCl and centrifuged at $4500\times g$. The supernatant was recovered, and the phenolic compounds were extracted with 10 mL of ethyl acetate twice. The

ethyl acetate extracts were combined and evaporated at 40 °C with argon. The dried extract was stored at -20 °C, and before analysis, it was suspended in 3 mL of 80% methanol. The extracts obtained from soluble and bound phenolic compounds were used for the trials of total phenols, total flavonoids, and antioxidant capacity.

2.8.1. Determination of Total Phenols

Phenolics compounds and antioxidant capacity assays were performed in a Barnstead International Turner SP-830 Plus spectrophotometer (Dubuque, IA, USA). To determine the content of phenols, 0.2 mL of each extract were taken and mixed with 2.6 mL of distilled water and 0.2 mL of Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min, 2 mL of 7% Na₂CO₃ was added, and the solution was stirred for 30 s. The reaction took place in the dark for 90 min, after which the absorbance of the samples was measured at 750 nm. The concentration of phenols was reported in equivalent milligrams of gallic acid per kilogram of the sample (mgGAE kg⁻¹), calculated from the calibration curve of gallic acid from 0 to 200 mg L⁻¹.

2.8.2. Determination of Total Flavonoids

Flavonoid content was determined by the reaction of the AlCl₃-NaNO₂-NaOH complex. From the extract, 0.2 mL were mixed with 3.5 mL of distilled water. Subsequently, 0.15 mL of 5% NaNO₂, 0.15 mL of 10% aluminium chlorhidre (AlCl₃) and 1 mL of 1 M NaOH were added at 5 min intervals between each reagent. The reaction proceeded for 15 min, and then the absorbance at 510 nm was measured. Total flavonoid content was reported in milligrams of equivalent catechin per kilogram of the sample (mgCatE kg⁻¹), calculated from the catechin calibration curve from 0 to 200 mg L⁻¹.

2.8.3. Determination of Condensed Tannins

Condensed tannins content was determined by the reaction of the vanillin-H₂SO₄ complex. From the extract, 0.25 mL was taken and mixed with 0.65 mL of 1% vanillin, then, 0.65 mL of 25% H₂SO₄ was added. Vanillin and H₂SO₄ were dissolved in methanol. The reaction proceeded for 15 min at 30 °C, and then absorbance at 500 nm was measured. Condensed tannins content was reported in milligrams of equivalent catechin per kilogram of the sample (mgCatE kg⁻¹), calculated from the calibration curve for catechin from 0 to 200 mg L⁻¹.

2.8.4. Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was evaluated using a 60 µM working solution in 80% methanol, with an absorbance adjusted to 0.98 at 517 nm, with 0.055 error. The assay was carried out by mixing 50 µL of the extract with 1.5 mL of the DPPH working solution; the reaction was left for 30 min in the dark, and the absorbance was determined.

The antioxidant capacity of ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) was determined using a working solution obtained by mixing 1 mL of ABTS at 7.4 mM and 1 mL of K₂S₂O₈, and allowing them to react for 12 h in the dark. The absorbance of the working solution was adjusted to 0.97 at 734 nm by diluting with methanol. The ABTS assay was performed by mixing 50 µL of the extract with 1.5 mL of ABTS working solution. The reaction was left for 30 min in the dark, and the absorbance was measured.

The antioxidant capacity of FRAP (ferric reducing antioxidant power) was determined using a working solution prepared by mixing 300 mM C₁₂H₉NaO₆·3H₂O (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, in 40 mM HCl), and 20 mM FeCl₃·6H₂O in a 10:1:1 ratio (V:V:V). The FRAP assay was prepared by mixing 50 µL of the extract with 1.5 mL of FRAP working solution; the reaction was left for 30 min in the dark at 37 °C, and the absorbance of the samples was taken at 593 nm.

Antioxidant capacity for the DPPH, ABTS, and FRAP assays were reported in millimoles of equivalent Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) per kilogram of the sample (mmol TE kg⁻¹), according to the calibration curve with Trolox in concentrations from 0 to 500 mmol L⁻¹.

The phenolic compound and the antioxidant capacity evaluations were done according to López-Contreras et al. [41].

2.9. Experimental design and Statistical Analysis

The crop was established using a completely randomized experimental design, with five treatments and five experimental units per treatment. Information from developmental variables for the crop (plant height, stem diameter, and chlorophyll content) was analyzed with a factorial arrangement of 5×4 (A \times B). Factor A was the ZnSO₄ and ZnO NPs concentrations (control, 1000 and 2000 mg L⁻¹), and factor B was the phenological stages of the crop (vegetative growth, flowering, fruit development, and maturity). Each plant was considered an experimental unit.

For the performance variables and physicochemical analysis, a completely randomized design with five experimental units per treatment was used, except for the functional analysis of capsaicinoids, phenolic compounds, and antioxidant capacity which included three experimental units. Results were reported as mean \pm standard deviation. Statistically significant differences between samples were analyzed with ANOVA, and the treatment means were compared with a Tukey test ($p \leq 0.05$) using the statistical package SPSS version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Growth of Pepper Plants

The variables of agronomic behavior were evaluated during the phenological development of the plants. The growth of the plants increased significantly from the flowering stage with the foliar application of ZnO NPs at a concentration of 1000 mg L⁻¹, but no significant differences were found between ZnSO₄ and the control (Figure 2a). However, it is important to note that the greatest increments in plant height were obtained with application of ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹. This behavior is enhanced from the FL, FG, and M stages, with increases of 10.5%, 8.6%, and 13.4%, respectively, compared to the control treatment. When compared with plants treated with ZnSO₄, although no significant differences were observed, increments of 5.8%, 4.2%, and 3.5%, respectively, were obtained. On the other hand, application of ZnO NPs and ZnSO₄ at 2000 mg L⁻¹ negatively affected plant height. Reductions with ZnO NPs were 16.7%, 4.7%, and 6.2%, while ZnSO₄ treatment reduced plant height by 5.1%, 5.0%, and 2.9%, in comparison to the control treatment.

The behavior in the development of stem diameter (Figure 2b) was similar to that of plant height, from stages FL, FG, and M, ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹ promoted stem growth. It should be noted that the increases obtained were 8.3%, 10.7%, and 27.9% higher than the control treatment, whereas, when compared to plants treated with ZnSO₄ the increases were 2.1%, 6.5%, and 18.7%, respectively. However, at 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs and ZnSO₄, height reductions were observed from stage FG to M. In the treatment with ZnO NPs at 2000 mg L⁻¹, reductions were 10.5% and 11.6%, while ZnSO₄ treatment reduced height by 4.1% and 1.5% compared to the control treatment plants.

Results from this research suggest that foliar application of ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹ had a greater impact on plant growth and physiology than conventional Zn (ZnSO₄) salts, probably due to greater capacity to be absorbed by the blade. Rossi et al. [15] compared the foliar fertilization of ZnO NPs and ZnSO₄ in plants of (*Coffea arabica* L.) at 10 mg L⁻¹ concentrations, and concluded that leaves treated with ZnO NPs contained higher Zn concentrations (1257.1 ± 367.2 mg kg⁻¹ DW) compared to plants treated with ZnSO₄ (344.1 ± 106.2 mg kg⁻¹ DW), while control plants had only a small amount of Zn in their leaves (53.5 ± 18.5 mg kg⁻¹ DW). This accumulation resulted in positive effects on the development of leaves and roots by 95% and 17%, respectively, compared to the control treatment. Altogether, these results indicate that Zn assimilation is more efficient when using particles of nanometallic zinc. Similar findings were found by Favari et al. [42]. They showed an increased growth in seedlings treated with ZnO NPs, while seedlings grown in ZnSO₄ grew slower. Foliar nanofertilizers can be more effective than conventional foliar fertilizers, since their release can be slow and gradual [43], but it is not yet specified if this effect is due to the absorption of the nanoparticle or due to the dissolution of its products [44,45].

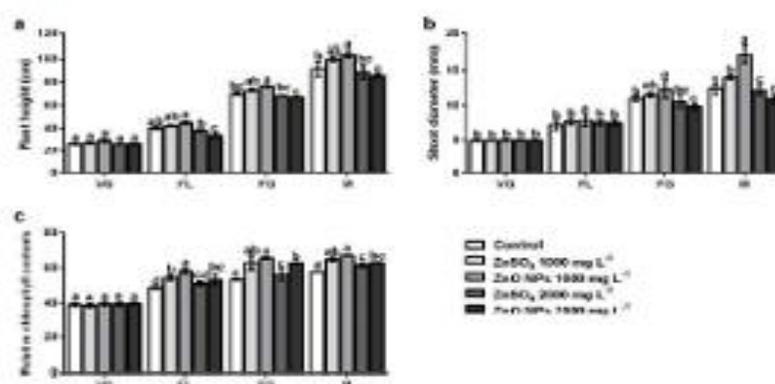


Figure 2. Effect of foliar application of $ZnSO_4$ and ZnO NPs on agronomic parameters (a) plant height (b) shoot diameter, (c) relative chlorophyll content characteristics in different phenological stages of the plant. (VG) vegetative growth, (FL) flowering, (FG) fruit development, (M) maturity. The values are the average of five repetitions. Means ($n = 5$). Bars represent the standard deviation of the mean. Different letters mean that treatments were statistically different (Tukey, $p < 0.05$) and represent the differences between treatments, within each phenological stage.

However, at concentrations of 2000 mg L^{-1} affected the development of the plant, possibly due to a phytotoxic effect. The difference in physiological impact between ZnO NPs and $ZnSO_4$ is attributed to a slower and more gradual release of the Zn^{2+} contained in the ZnO NPs. A study conducted by Reed et al. [46] mentioned that dissolution of ZnO NPs in deionized water (DI) is relatively slow and gradual, with only 2% of dissolved Zn starting after 24 h. On the contrary, $ZnSO_4$ is highly soluble with very little retention within the plant. Therefore, Zn bioavailability over a prolonged period is inefficient [16].

3.2. Relative Chlorophyll Content

Relative chlorophyll content was determined by SPAD measurements during the phenological development of the plants. As shown in Figure 2c, results indicate that relative chlorophyll content increased significantly during the development of the plants and by foliar application of ZnO NPs and $ZnSO_4$ at both concentrations. However, leaves that accumulated the highest chlorophyll content were treated with ZnO NPs at 1000 mg L^{-1} . This behavior was observed from stages FL, FG, and M, with rises of 19.4%, 22.9%, and 16.2%, respectively, compared to the control. In contrast, foliar applications for both treatments at 2000 mg L^{-1} showed reductions: with ZnO NPs, chlorophyll content decreased 8.5%, 4.3%, and 6.2%, while $ZnSO_4$ caused reductions by 12.2%, 14.4%, and 8.4% in stages FL, FG, and M, respectively, compared to the treatment that produced the highest accumulation (ZnO NPs at 1000 mg L^{-1}).

Our results are consistent with Prasad et al. [16], who reported a higher content of chlorophyll ($1.97 \text{ mg g}^{-1} \text{ rt.wt}$) in peanut leaves by foliar application of ZnO NPs at 1000 mg L^{-1} (25 nm) compared to $ZnSO_4$. Mukherjee et al. [24], in studies conducted in green pea plants (*Pisum sativum* L.), evaluated the impact of different ZnO NPs (10 nm), 2% by weight of doped alumina (Al_2O_3 ZnO NPs, 15 nm), 1% by weight of NPs coated with aminopropyltriethoxysilane (KH550, ZnO NPs 20 nm) and ionic Zn (Zn chloride) at 1000 mg kg^{-1} . All treatments resulted in 2.4 to 3.6 fold increments in chlorophyll accumulation, compared to the control, although there were no significant differences between different Zn types.

The observed increases in the chlorophyll content are due to the fact that Zn plays an essential role in the metabolism of plants, by influencing the activity of important enzymes such as carbonic anhydrase containing a Zn atom that catalyzes the hydration of CO_2 that facilitates the diffusion of

carbon dioxide to the carboxylation sites in plants [47,48]. The above is in agreement with the findings reported by Pullagurala et al. [48], indicated that the application ZnO NPs at 100 mg kg⁻¹, 200 mg kg⁻¹, and 400 mg kg⁻¹ increased the relative chlorophyll content by 41%, 37%, and 58%, respectively, in comparison with the control plants. According to Raliya and Tarafdar [27], the foliar application of ZnO NPs to plants of *Cyamopsis tetragonoloba* L. at 10 mg L⁻¹ significantly increased the biomass of the plant (27.1%) and the chlorophyll content (276.2%). Thus, the observed increases in plant growth at a concentration of 1000 mg L⁻¹ with ZnO NPs are due to the increase in chlorophyll content, since it is a common indicator of the photosynthetic efficiency of a plant, which is one of the most important determinants of its growth [21].

Even though Zn is an essential micronutrient for growth and metabolism of plants [2] and it is necessary for chlorophyll production [49], harmful responses to high Zn concentrations may be closely related to the generation of reactive oxygen species (ROS). Additionally, displacement of some other metals from the active sites in proteins [50] can affect chlorophyll biosynthesis and damage the photosynthetic system [51]. Chlorophyll content has been classified as a reliable indicator of contamination and toxicity of heavy metals in plants [52]. Therefore, high levels of Zn in plants could reduce chlorophyll content as a response to oxidative stress by this element.

3.3. Fruit Yield and Plant Biomass

Results for variables associated to yield and biomass accumulation are shown in Table 1. For all the variables tested, significant differences were obtained ($p \leq 0.01$). Plants exposed to foliar application of 1000 mg L⁻¹ of ZnO NPs produced the highest number of fruits, exceeding by 15.3% and 8.6% the control treatment and the ZnSO₄-treated plants. In contrast, at 2000 mg L⁻¹ ZnO NPs and ZnSO₄, there were slight decreases (13.6% and 7.3%), compared to the control treatment. Similarly, maximum average fruit weight was obtained with ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹, exceeding by 7% the control treatment and by 3.6% the ZnSO₄ treatment. At 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs and ZnSO₄, there are reductions of 5.8% and 3.8% respectively, compared to the control treatment. The trend was similar for fruit total weight: the highest weight was obtained with ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹ (Table 1), exceeding by 21.2% the control and 11.8% the ZnSO₄ treatment. At 2000 mg L⁻¹, both treatments (ZnO NPs and ZnSO₄) showed decreases of 18.6% and 10.8%, respectively, in comparison to the control.

Table 1. Effect of foliar application of ZnO NPs and ZnSO₄ on fruit development and biomass accumulation.

Treatments (mg L ⁻¹)	Number of Fruits	Average Fruit Weight (g)	Total Weight of Fruits (g)	Fresh Aerial Biomass (g)	Dry Aerial Biomass (g)
Control	54.20 ± 2.28 c	8.80 ± 0.22 ab	476.97 ± 23.74 ab	893.85 ± 11.00 b	294.80 ± 11.33 c
ZnSO ₄ 1000	58.50 ± 1.29 b	9.12 ± 0.11 ab	533.78 ± 11.93 ab	905.09 ± 5.88 b	310.81 ± 3.44 b
ZnO NPs 1000	64.00 ± 2.24 a	9.46 ± 0.12 a	605.20 ± 17.27 a	925.64 ± 4.09 a	304.91 ± 5.09 a
ZnSO ₄ 2000	50.25 ± 1.50 d	8.46 ± 0.07 b	425.20 ± 11.19 b	879.46 ± 5.99 c	278.56 ± 8.59 d
ZnO NPs 2000	46.80 ± 2.39 d	8.29 ± 0.11 b	387.99 ± 18.71 b	868.22 ± 2.42 c	264.42 ± 4.92 e

Values are the average of five repetitions. Means (n = 5) ± standard deviation. Different letters in each column means that the treatments were statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

The dry and fresh weight of aerial biomass was significantly affected ($p \leq 0.01$) by the foliar application of ZnO NPs and ZnSO₄. Plants treated with 1000 mg L⁻¹ of ZnO NPs showed the greatest increase in biomass accumulation: in the case of fresh weight, it increased by 3.4% and 2.2%, while dry weight increased by 9.2% and 4.3% compared to control and ZnSO₄ treatments. However, at 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs, the greatest reductions in fresh and dry biomass accumulation were obtained: reductions of 2.9% and 10.3% respectively, compared to the control.

In this research, foliar application of ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹ positively influenced growth of pepper plants and fruit production, and it produced more favorable effects than ZnSO₄ fertilization. This could be due to greater Zn assimilation when applied in the form of ZnO NPs with greater leaf penetration ability [18], however, higher concentrations (2000 mg L⁻¹) caused toxicity. These results

agree with those reported by Lin and Xing [53] in radish, rapeseed, corn, lettuce, and cucumber. Prasad et al. [16] mentioned that ZnO NPs are absorbed by plants to a greater extent compared to ZnSO₄ because of greater bioavailability due to their size and lower solubility in water. They tested this behavior in peanut plants. Application of 1000 mg L⁻¹ of ZnO NPs increased more effective growth and yield of the pod by 34% compared to ZnSO₄ treatment, however, at a higher concentration (2000 mg L⁻¹) ZnO NPs were harmful. Similar results were obtained by Khanm et al. [54] when treating tomato plants with 1000 mg L⁻¹ of ZnO NPs. They observed that plant growth, yield, and Zn accumulation increased significantly with respect to ZnSO₄ treatment and control. These results confirmed that the physiological effects were related to greater availability of Zn when applied with particles of nanometric size.

The effectiveness of ZnSO₄ by the foliar application is low because it is highly soluble and leaches quickly [8]. These characteristics affect nutrient availability. Highly water-soluble ions may have difficulty penetrating the lipophilic cuticle, thus limiting availability in the case of ZnSO₄ fertilization [16]. Yet, NPs have been shown to enter cells through the stomatal or vascular system [27,55] depending on the size range of ZnO particles. This supports the current hypothesis of NPs penetration in the plant cell through the hydrophilic pathway of the polar aqueous pores in the cuticle and stomata [56,57]. The diameter of cuticular pores has been estimated at 2 nm [56], and the stomatal path appears as the most feasible route for the penetration of NPs, with a limit of size exclusion above 10 nm [57]. However, there are some alternative findings in the literature, which reported that the foliar application of Au NPs at 280 ng per plant in sizes of 3, 10, and 50 nm, managed to penetrate the leaf cuticle independently of its size and coating and, they accumulated mainly in younger shoots (10–30%) and in the roots (10–25%), and 5–15% of the NPs < 50 nm were exuded to the rhizosphere soil [58]. Other authors mention that NPs in a range of 4 to 100 nm can cross the cuticle of the leaf by breaking the waxy layer [59]. In this study, the applied nanoparticles were in a range of 12 to 24 nm, so there is the possibility that the largest size ZnO NPs (24 nm) could pass through the cuticle of the leaf. Although, it is probable that the size and properties of NPs play an important role in their interaction with the leaves of the plant, their absorption in the leaf and their transport within the plant is determined by the different characteristics of the leaf (such as the stomata, trichomes, or cuticle), which present a wide range of diversity among species [58,60].

On the contrary, reduction in biomass accumulation could be due to a greater negative impact of ZnO NPs, toxic Zn concentrations (2000 mg L⁻¹) could negatively affect cellular K⁺ content, permeability, hydraulic conductivity, and water content, which decrease fresh weight of the organs, assimilate movement from leaves to fruits, and yield [61].

3.4. Chromatic Characteristics

Determination of chromatic characteristics of the fruits revealed significant differences ($p \leq 0.01$) among treatments for variables L*, b*, and C* (Table 2). Although in a* and h the treatments were statistically equal, values showed a tendency to increase with applications of ZnO NPs and ZnSO₄, but the differences were not significant. Maximum values of L* (53.46) were detected in the fruits from plants treated with ZnO NPs at 2000 mg L⁻¹, which indicates greater luminosity of the fruits when compared to values obtained in the control and ZnSO₄ treatments. Readings for a* and b* showed the same tendency, with values of 33.45 (a*) and 43.59 (b*). This indicates that the tendency to the red and yellow color of the fruit increased with the application of ZnO NPs at high concentrations (2000 mg L⁻¹).

Color saturation (C*) presented a pattern similar to that of L* with a value of 53.43. This means that the intensity of the orange color of the fruit increased with ZnO NPs at 2000 mg L⁻¹. Determination of h differentiated the color perceived in the fruits, with a tendency of red to yellow. In this work, CIELAB (L*, a*, b*) and CIELCH (L*, C* and h) values explained the differences in pericarp color of the fruits obtained from the different treatments [62].

Currently, there are no reports of the evaluation of color in fruits obtained from plants treated with metal NPs. However, in *Capsicum*, the color of the fruit is determined mainly by the composition and concentration of carotenoids [63]. The biosynthesis of these compounds and their accumulation

in fruits is influenced by different factors as a defense mechanism against various biotic and abiotic stresses [64,65].

Table 2. Chromatic characteristics in habanero pepper fruits obtained from plants treated with ZnO NPs and ZnSO₄.

Treatments (mg L ⁻¹)	Chromatic Parameter					View
	L*	a*	b*	C*	h	
Control	50.02 ± 1.08 b	30.57 ± 1.93 a	38.92 ± 1.33 b	49.37 ± 1.97 b	51.77 ± 1.46 a	
ZnSO ₄ 1000	51.29 ± 1.76 b	32.06 ± 0.85 a	41.98 ± 1.11 a	50.77 ± 1.32 b	52.33 ± 1.00 a	
ZnO NPs 1000	51.99 ± 1.11 ab	32.33 ± 1.45 a	42.48 ± 2.13 a	51.81 ± 0.76 ab	53.71 ± 1.24 a	
ZnSO ₄ 2000	51.92 ± 1.46 ab	32.07 ± 0.84 a	41.91 ± 1.42 a	51.75 ± 1.01 ab	53.30 ± 1.25 a	
ZnO NPs 2000	53.46 ± 1.15 a	33.45 ± 1.20 a	43.59 ± 1.47 a	53.43 ± 1.64 a	53.84 ± 1.44 a	

Values are the average of five repetitions. Means (n = 5) ± standard deviation. Different letters in each column means that the treatments were statistically different (Tukey, $p < 0.05$).

García-Gómez et al. [21] evaluated the effect of ZnO NPs and ZnSO₄ on antioxidant defenses in tomato plants, the results indicated that ZnO NPs generated greater toxicity and stimulated the concentration of carotenoids and biological markers of oxidative stress (ROS). Some studies, have shown that ZnO NPs can induce oxidative stress and modify the activity of antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidant compounds [19,66], which operate together to protect plant cells against oxidative damage. Pérez-Labrada et al. [67] reported that foliar application of Cu NPs induced an increase in the content of vitamin C and carotenoids (lycopene) in fruits compared to the levels obtained in the control treatment. This study the evaluation of plant growth showed a greater sensitivity to the application of ZnO NPs, since at 1000 mg L⁻¹ stimulated the growth of plants, while at 2000 mg L⁻¹ there was a reduction in the development of the plants possibly due to a phyto-toxic effect. However, the fruits obtained in both treatments reported the greatest increases in nutraceutical and functional compounds, the increases observed in the accumulation of these compounds reflect a redox state modified by the application of ZnO NPs that affect the level of cellular ROS [68].

Therefore, these results suggest that the fruits of the plants treated with the foliar application of ZnO NPs intensified their orange color due to the increased production of carotenoids in response to oxidative stress. The main function of carotenoids is the protection of cells and organelles against oxidative damage, which they achieve by interacting with singlet oxygen molecules (O₁), eliminating peroxy radicals (LOO⁻) and preventing accumulation [69]. Although the investigation of the effect of the application of ZnO NPs on the chromatic characteristics of the fruit, the accumulation of carotenoids and phenolic compounds is very scarce, the role of the previous compounds against the stress induced by metallic NPs is uncertain [68].

3.5. Quality of Habanero Pepper Fruit

The results in Table 3 show that foliar application of ZnO NPs and ZnSO₄ significantly affected ($p < 0.01$) titratable acidity of fruits. Maximum titratable acidity (0.155 ± 0.0055) was obtained with 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs, while the minimum value (0.119 ± 0.0050) of titratable acidity was recorded in fruits from the control treatment. In addition, fruit pH was also affected ($p < 0.01$) by the treatments with ZnO NPs and ZnSO₄ (Table 3). The highest value was obtained with the control treatment (5.63 ± 0.114), while the lowest pH (5.40 ± 0.040) was found with ZnO NPs at 2000 mg L⁻¹, however, no significant differences were observed between the Zn-based treatments with different concentrations. Fruit pH correlates with acidity, and citric acid is the primary organic acid found in most fruits [70]. With respect to soluble solids, all treatments showed higher values than the control treatment. The treatment level with 2000 mg L⁻¹ ZnO NPs produced the highest amount (11.33 ± 0.72), while the lowest value was obtained in the control (9.32 ± 0.79). As a result, fertilization with ZnO NPs and ZnSO₄ also significantly increased ($p < 0.05$) fruit firmness. The highest increase (15.35 ± 0.54) was obtained with 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs, and the lowest value was found (14.79 ± 0.63) in fruits from the control treatment.

Table 3. Effect of foliar application of ZnO NPs and ZnSO₄ on fruit development and biomass accumulation.

Treatments (mg L ⁻¹)	TA (%)	pH	Soluble Solids (%)	Firmness (N)	Cutting force (N)
Control	0.119 ± 0.0050 d	5.63 ± 0.134 a	9.32 ± 0.79 d	14.79 ± 0.63 b	11.35 ± 0.83 a
ZnSO ₄ 1000	0.126 ± 0.0012 cd	5.49 ± 0.030 b	10.18 ± 0.38 c	14.94 ± 0.65 ab	11.39 ± 0.77 a
ZnO NPs 1000	0.134 ± 0.0025 b	5.42 ± 0.048 b	10.77 ± 0.60 b	15.11 ± 0.68 ab	11.43 ± 0.64 a
ZnSO ₄ 2000	0.130 ± 0.0020 bc	5.50 ± 0.025 b	10.48 ± 0.52 bc	15.20 ± 0.63 ab	11.36 ± 0.72 a
ZnO NPs 2000	0.155 ± 0.0055 a	5.40 ± 0.040 b	11.33 ± 0.72 a	15.35 ± 0.54 a	11.32 ± 0.47 a

Values are the average of five repetitions. Means (n = 5) ± standard deviation. Different letters in each column means that the treatments were statistically different (Tukey, $p < 0.05$).

Our results are in agreement with those obtained by Davarparah et al. [1], who mentioned that foliar fertilization with ZnO NPs at a concentration of 120 mg L⁻¹ led to significant improvements in quality of pomegranate fruits, including increases of 4.4–7.6% in soluble solids, decreases of 9.5–29.1% in titratable acidity, increases of 20.6–46.1% in maturity index, and increments of 0.28–0.62% in juice pH. The physical characteristics of the fruit were not affected. Previous studies have reported that foliar application of micronutrients such as Zn and Fe are essential to increase yield, quality, and content of ascorbic acid in tomato fruits [71].

In this study, the increases in soluble solids and firmness of fruits under fertilization with ZnO NPs and ZnSO₄ could be attributed to the role that Zn plays in the synthesis and transference of carbohydrates and proteins [72], in addition to maintaining the structural stability of cell membranes [73]. These facts indicate that Zn availability and concentration by foliar fertilization with ZnO NPs during the main stages of vegetative growth were more effective and have important physiological functions that could improve fruit quality. These results might be attributed to Zn movement from leaf tissues through the phloem to fruits at the moment of development and maturation [23].

3.6. Capsaicin and Dihydrocapsaicin Content

Results indicated that capsaicin content was significantly affected ($p < 0.01$) by application of foliar fertilization with ZnO NPs and ZnSO₄ (Figure 3a). The highest accumulation was detected at 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs (625.44 ± 14.47 mg kg⁻¹), which was 19.3% higher than the control treatment (504.60 ± 16.73 mg kg⁻¹). The same trend was observed in dihydrocapsaicin content: although the treatments were statistically equal ($p < 0.423$), accumulation increased in both treatments (Figure 3a). Treatment at 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs caused the greatest increase with 10.9% (326.71 ± 6.50 mg kg⁻¹) compared to the control (290.84 ± 2.80 mg kg⁻¹). Quantitative analysis of capsaicinoids by HPLC revealed that the total content of these compounds increased in fruits obtained from plants treated with ZnO NPs (Figure 3a). The highest concentration of capsaicinoids was detected in mature fruits from plants treated with 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs, with a maximum value of 952.15 ± 8.17 mg kg⁻¹ that exceeded by 16.4% the control (795.43 ± 19.54 mg kg⁻¹), while the values obtained with ZnSO₄ at 2000 mg L⁻¹ were statistically the same as the control. The chromatogram in Figure 4a corresponds to capsaicin and dihydrocapsaicin standards, with retention times of 6.354 min (peak 1) and 9.661 min (peak 2), respectively.

There is a direct correlation between total capsaicinoids content and pungency in pepper fruits. Fruit SHU also increased significantly ($p < 0.01$) by fertilization with ZnO NPs (Figure 3b). The highest increase of 16.4% (153,296.1 ± 1315.79 SHU²) was obtained at a concentration of 2000 mg L⁻¹ with ZnO NPs, while the control had the lowest accumulation (128,065.0 ± 3146.93 SHU²). On the other hand, the values obtained for SHU² with ZnSO₄ at 2000 mg L⁻¹ did not show significant increases. The SHU scale measures the pungency of peppers, and it depends on the concentration of capsaicin and dihydrocapsaicin. The SHU can be classified as (1) non-spicy (0–700 SHU²), (2) slightly spicy (700–3000 SHU²), (3) moderately spicy (3000–25,000 SHU²), (4) highly spicy (25,000–70,000 SHU²), and (5) very hot (>80,000 SHU²) [74]. Based on our results, the habanero pepper fruits harvested in this study are classified as very spicy fruits; however, total capsaicinoid concentration, and thus SHU², increased sharply with the application of ZnO NPs at high concentrations (2000 mg L⁻¹).

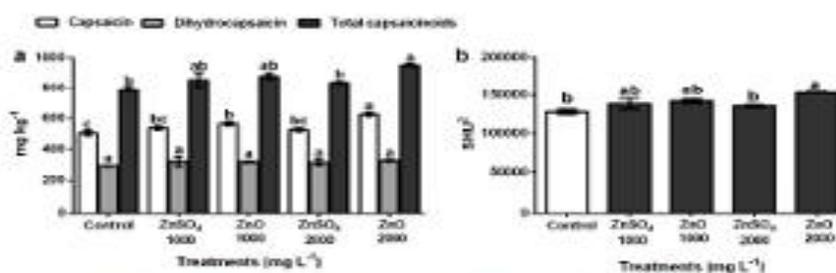


Figure 3. Capsaicinoids content in habanero pepper fruits from plants treated with ZnO NPs and ZnSO₄. (a) capsaicin, dihydrocapsaicin and total capsaicinoids, (b) Scoville Heat Units (SHU). Values are the average of three repetitions. Means ($n = 3$). Bars represent the standard deviation of the mean. Different letters in each bar mean that the treatments were statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

This behavior relates to capsaicinoids as main antioxidants in peppers [35] and their protective functions against ROS [75]. Therefore, it is possible that the sharp increase observed is due to oxidative stress caused by ZnO NPs [19], because metal NPs alter Ca²⁺ and ROS concentrations involved in cell signaling and complex physiological and biochemical changes at the organism level [76]. In this case, the plant defense system accumulated higher concentrations of enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds, which resulted in greater capsaicinoid accumulation (Figure 3). Figure 4b,c,e show the chromatograms and retention times for the compounds of the control fruits and the ZnSO₄ treatments, while Figure 4d,f represent the retention times obtained for the treatments with ZnO NPs.

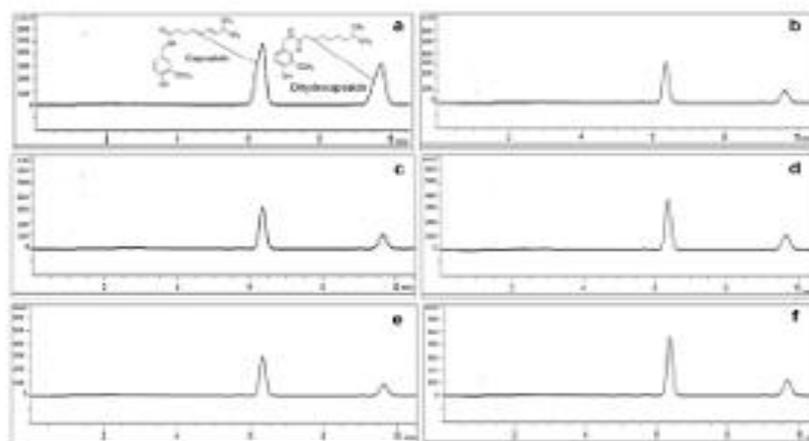


Figure 4. Chromatograms for capsaicin and dihydrocapsaicin in habanero pepper fruits from plants treated with ZnO NPs and ZnSO₄. (a) standards, (b) control, (c) 1000 mg L⁻¹ ZnSO₄, (d) 1000 mg L⁻¹ ZnO NPs, (e) 2000 mg L⁻¹ ZnSO₄, (f) 2000 mg L⁻¹ ZnO NPs.

3.7. Total Phenols, Total Flavonoids and Condensed Tannins

Results indicate that the foliar application of ZnO NPs significantly affected ($p \leq 0.01$) phenols and total flavonoids (soluble + bound) content in the fruits. In all analyses of phenolic compounds,

the soluble portion had the highest concentrations of phenols and flavonoids, while the lowest concentration was found in bound compounds. The highest concentration of total phenols (soluble + bound) was obtained with applications of ZnO NPs: in the treatment with 1000 mg L⁻¹ the content was 1442.76 mgGAE kg⁻¹, while for 2000 mg L⁻¹ it was 1504.60 mgGAE kg⁻¹ (Table 4), exceeding by 10.8% and 14.5% the control treatment. The concentrations obtained with ZnSO₄ were 1290.55 mgGAE kg⁻¹ for 1000 mg L⁻¹ and 1299.93 mgGAE kg⁻¹ for 2000 mg L⁻¹, without presenting significant statistical differences in comparison with the control. When compared to values obtained with ZnO NPs at the same concentrations, these amounts were 10.5% and 13.6% smaller respectively.

Table 4. Content of total phenols and total flavonoids (soluble + bound) in habanero pepper fruits obtained from plants treated with ZnO NPs and ZnSO₄.

Treatments (mg L ⁻¹)	Total Phenolics (mgGAE kg ⁻¹)			Total Flavonoids (mgCatE kg ⁻¹)		
	Free	Bound	Total	Free	Bound	Total
Control	1154.85 ± 10.55 b	113.50 ± 4.30 b	1268.35 b	114.35 ± 5.52 b	69.30 ± 2.71 c	183.65 b
ZnO ₄ 1000	1168.44 ± 17.76 b	122.11 ± 6.55 b	1290.55 b	116.95 ± 10.22 b	79.28 ± 5.83 bc	196.24 b
ZnO NPs 1000	1293.42 ± 28.30 a	149.34 ± 6.45 a	1442.76 a	144.63 ± 9.23 a	92.54 ± 5.29 ab	237.17 a
ZnO ₄ 2000	1176.24 ± 15.61 b	123.68 ± 4.98 b	1299.93 b	119.73 ± 6.89 a	76.62 ± 4.43 c	196.35 b
ZnO NPs 2000	1347.41 ± 30.06 a	157.18 ± 7.58 a	1504.60 a	135.01 ± 8.04 a	96.50 ± 6.20 a	251.50 a

Values are the average of three repetitions. Means (n = 3) ± standard deviation. Different letters in each column means that the treatments were statistically different (Tukey, p < 0.05).

This behavior was also observed for total flavonoids content (Table 4). The highest concentration of total flavonoids (soluble + bound) was found at 1000 mg L⁻¹ and 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs, with values of 237.17 mgCatE kg⁻¹ and 251.50 mgCatE kg⁻¹, respectively, exceeding by 22.5% and 26.9% the control treatment. However, concentrations obtained with ZnSO₄ at 1000 mg L⁻¹ (196.24 mgCatE kg⁻¹) and 2000 mg L⁻¹ (196.35 mgCatE kg⁻¹) were 21.9% and 17.2% lower than those obtained at the same concentrations of ZnO NPs and when compared with the control, there are no significant statistical differences. The content of phenolic compounds is considered one of the most important nutraceutical value parameters in habanero pepper fruits [77]. Similar concentrations of phenolic compounds have been found in orange habanero peppers (169.97 mg GAE 100 g⁻¹), while other genotypes of habanero peppers grown in Yucatan, Mexico have lower concentrations (20.54 mg 100 g⁻¹ to 20.75 mg 100 g⁻¹) [78]. The presence of condensed tannins was not detected in any of the samples. In this study, the effects caused (beneficial and toxic) by the foliar application of ZnO NPs in plants were higher than those caused by ZnSO₄ in the same concentrations. For example, the highest accumulation of phenolic compounds and total flavonoids was obtained in the harvested fruits of the plants that were treated with 1000 and 2000 mg L⁻¹ ZnO NPs. To date, there are no reports comparing the effect of ZnO NPs and ZnSO₄ on the accumulation of bioactive compounds in habanero pepper fruits. However, our findings suggest that the effect could be related to a specific mechanism of the nanoparticles in the plant system, since the ZnO NPs treatments generated the greatest physiological and biochemical changes in the plants. Some authors mentioned that the toxicity generated by the ZnO NPs is due to the internalization of the NPs, the accumulation in the tissue and the dissolution of the zinc ions [79], this suggests that the ZnO NPs can induce toxicity through the activity of the ions that are released during a prolonged period and can generate a greater stimulation in the formation of ROS.

Additionally, the difference in accumulation of phenolic compounds caused by ZnO NPs differs from those caused by ZnSO₄ in the same concentrations (1000 mg L⁻¹ and 2000 mg L⁻¹), this can be explained because ZnSO₄ is highly soluble and when applied to the leaves of plants it can fall rapidly, therefore, the bioavailability of Zn ions with the use of ZnSO₄ during an extended period is not safe [9,16]. Therefore, it is important to take into account that the foliar application of ZnSO₄ could not generate the same stress as the ions obtained by the ZnO NPs, since the NPs have a higher transport potential and, therefore, a greater bioavailability and absorption that allows them to interact with intracellular structures that stimulate ROS formation [80,81]. However, other authors emphasized that the phytotoxicity of ZnO NPs cannot be explained only by dissolved ions since the properties of NPs can be affected by the means of exposure to plants [82,83].

Zafar et al. [84] indicated that the application of ZnO NPs induced oxidative stress in the shoots of *Brassica nigra* and, interestingly, observed an increase in the non-enzymatic antioxidant molecules such as phenolic compounds and flavonoids due to the accumulation of ROS. The results of the experiment conducted by Pinedo-Guerrero et al. [35] also reported that the application of Cu NPs in chitosan-PVA hydrogels at a concentration of 2.0 mg in jalapeño pepper plants increased the accumulation of phenols in fruits (64.71 mgGAE 100 g⁻¹), surpassing (in 5.9% the control, the increase was associated with an increase in oxidative stress generated by ROS).

Plants have developed various protection mechanisms to limit oxidative damage caused by ROS through the production of antioxidants such as phenols, carotenoids and antioxidant enzymes [26]. Phenolic compounds play a prominent role in detoxification mechanisms of ROS [85] as electron donors in organelle structures and can directly eliminate the molecular species of active oxygen, mainly due to their redox properties. They act in absorption and neutralization of free radicals, extinction of singlet and triplet oxygen or decomposition of peroxides [86]. This behavior explains the highest accumulation of phenols and flavonoids in the fruits from plants exposed to treatments with ZnO NPs.

3.8. Antioxidant Capacity

In Table 5, significant differences ($p \leq 0.01$) were observed among treatments in the antioxidant capacity assays of ABTS, DPPH, and FRAP. In all analyses, the soluble portion had the highest antioxidant capacity. Results indicate that total antioxidant activity (soluble + bound) was from 83.28 mmolTE kg⁻¹ to 98.49 mmolTE kg⁻¹, from 145.29 mmolTE kg⁻¹ to 213.16 mmolTE kg⁻¹, and from 235.25 mmolTE kg⁻¹ to 296.06 mmolTE kg⁻¹ in ABTS, DPPH, and FRAP, respectively (Table 5). According to results of phenolic content, the three methods of antioxidant capacity had the highest values for treatments with ZnO NPs at concentrations of 1000 mg L⁻¹ and 2000 mg L⁻¹ and were statistically different from the control and ZnSO₄ treatments (Table 5). Correlations between total phenolic content ($r = 0.95$, 0.94 , and $r = 0.80$, respectively), total flavonoids ($r = 0.95$, 0.89 , and $r = 0.80$, respectively) and antioxidant capacity measured by FRAP, DPPH, and ABTS suggest that higher values of phenolic compounds in the habanero peppers are related to greater antioxidant capacity. Similar patterns have been reported in jalapeño pepper fruits [35], peppers of the *Capsicum* genus [87] and jalapeño and serrano peppers [88].

Previous studies have shown that ZnO NPs can generate cytotoxicity due to the production of ROS [55]. The induction and biosynthesis of phenolic compounds are related to stress caused by heavy metals. This response may explain the large accumulation of these compounds in fruits from plants exposed to ZnO NPs [89], and it could be the main reason for the observed higher antioxidant activities [90]. A study conducted by Zare et al. [91] showed that synthesized ZnO NPs had higher antioxidant activity (ABTS and DPPH) compared to ZnO microparticles. The biological and antioxidant effectiveness of ZnO NPs depends on particle size and shape [12]. In this study, the application of ZnO NPs generated the highest accumulation of phenolic compounds in fruits and resulted in increases in antioxidant activities.

Table 5. Antioxidant activity in habanero pepper fruits obtained from plants treated with ZnO NPs and ZnSO₄.

Treatments (mg L ⁻¹)	ABTS (mmolTE kg ⁻¹)		DPPH (mmolTE kg ⁻¹)		FRAP (mmolTE kg ⁻¹)	
	Free	Bound	Free	Bound	Free	Bound
Control	76.60 ± 3.19 b	6.68 ± 4.30 c	112.97 ± 5.52 b	32.33 ± 2.71 c	172.75 ± 4.68 b	61.50 ± 3.25 b
ZnSO ₄ 1000	83.33 ± 3.18 ab	7.95 ± 6.55 b	121.67 ± 10.22 b	35.60 ± 5.83 c	180.86 ± 5.19 b	65.19 ± 3.51 b
ZnO NPs 1000	86.77 ± 2.75 a	8.75 ± 6.43 ab	154.98 ± 9.53 a	49.70 ± 5.39 b	198.22 ± 5.14 a	80.51 ± 0.66 a
ZnSO ₄ 2000	81.08 ± 3.18 ab	8.12 ± 4.98 b	130.31 ± 6.89 b	38.19 ± 4.43 c	180.30 ± 6.73 b	67.61 ± 3.08 b
ZnO NPs 2000	89.14 ± 2.96 a	9.35 ± 7.91 a	156.55 ± 8.04 a	56.61 ± 6.20 a	212.21 ± 8.35 a	83.85 ± 1.97 a

Values are the average of five repetitions. Means ($n = 3$) ± standard deviation. Different letters in each column means that the treatments were statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

4. Conclusions

The application of ZnO NPs affected the development of pepper plants. At a concentration of 1000 mg L⁻¹, it promoted plant growth, and increased number and average weight of the fruits, while at 2000 mg L⁻¹, it promoted negative effects on growth and development of the crop. Therefore, the ZnO NPs effect depends on the concentration applied. In contrast, the effect of the application of ZnSO₄ at concentrations of 1000 and 2000 mg L⁻¹ was lower and had minor effects on crop yield. On the other hand, foliar application of ZnO NPs at 2000 mg L⁻¹ led to significant improvements in fruit quality, including increases in titratable acidity, soluble solids, and decreases in pH without significant differences between treatments with Zn. Likewise, accumulation of total capsaicinoids in fruits from plants treated with 1000 mg L⁻¹ and 2000 mg L⁻¹ of ZnO NPs reached 581.57 mg Kg⁻¹ and 952.15 mg Kg⁻¹, respectively, which resulted in significant increases in SHU. In the same way, application of ZnO NPs at 1000 mg L⁻¹ and 2000 mg L⁻¹ increased phenols and total flavonoids (soluble + bound) content in habanero pepper fruits that resulted in increased antioxidant capacity according to ABTS, DPPH, and FRAP assays.

In summary, results of this study demonstrate the influence of the foliar application of ZnO NPs and ZnSO₄ on development and yield of habanero pepper plants.

Author Contributions: G.N.-M. and J.J.G.-L. and E.O.-S. conceived and designed the experiments; J.J.G.-L. performed the experiments; P.A.R.-S. HPLC Methodology; G.N.-M., J.J.G.-L., F.Z.-G. and E.O.-S. analyzed data; G.N.-M., R.H.L.-S., E.D.B.-C., E.O.-S., and R.V.-A. and contributed reagents, materials, and analysis tools; G.N.-M. and J.J.G.-L. wrote original draft; G.N.-M., F.Z.-G. and J.J.G.-L. revised and approved proofread.

Funding: The Article Processing Charges was funded by Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP) through the call Gastos de Publicación Individuales.

Acknowledgments: J.J.G.-L. acknowledges the doctorate scholarship 306970 given by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). G.N.-M. acknowledges CONACYT the previous funding from the project 169635-Investigación Científica Básica. R.H.L.-S. acknowledges CONACYT the previous funding from the project 268-Fronteras de la Ciencia.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Davarpanah, S.; Tehraniyar, A.; Davarynejad, G.; Abadía, J.; Khorasani, R. Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Andestani) fruit yield and quality. *Sci. Hort.* **2016**, *210*, 57–64.
2. Narendhran, S.; Rajiv, P.; Sivaraj, R. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth of *Sesamum indicum* L. in zinc deficient soil. *Int. J. Plant. Sci.* **2016**, *3*, 365–371.
3. Singh, R.S.; Ram, S. Studies on the use of palm growth substances for fruit retention in mango cv. Dasbehair. *Indian J. Hort.* **1983**, *40*, 188–194.
4. Khan, N.; Malik, A.B.; Makhdoom, M.I.; Hag, A. Investigations on the efficiency of exogenous synthetic growth regulators on fruit drop in mango (*Mangifera indica* L.). *Egypt J. Hort.* **1993**, *20*, 1–14.
5. Cakmak, I. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. *New Phytol.* **2000**, *146*, 185–205.
6. Sadeghzadeh, B.; Rengel, Z. Zinc in soils and crop nutrition. In *Molecular Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*; Hawkesford, M.J., Barradough, P., Eds; Wiley: London, UK, 2011; pp. 335–376.
7. Rengel, Z. Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* **2001**, *32*, 1163–1186.
8. Fageria, N.K.; Baligar, V.C.; Clark, R.B. Micronutrients in crop production. *Adv. Agron.* **2002**, *77*, 189–272.
9. Dookette, C.L.; Read, T.L.; Li, C.; Scheckel, K.G.; Donner, E.; Kopitka, P.M.; Lombi, E. Foliar application of zinc sulphate and zinc EDTA to wheat leaves: Differences in mobility, distribution, and speciation. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 4469–4481.
10. Read, T.L.; Dookette, C.L.; Creswell, T.; Howell, N.R.; Augtherson, R.; Karatchevskaya, I.; Lombi, E. Investigating the foliar uptake of zinc from conventional and nano-formulations: A methodological study. *Environ. Chem.* **2019**, In Press.

11. Tucuch, H.C.J.; Alcántar, G.G.; Ordaz, Ch.V.M.; Santiso, R.J.A.; Larqué, S.A. Production and quality of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) with different $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratios and size of substrate particles. *Terra Latinoam.* **2012**, *30*, 9–15.
12. Singh, A.; Singh, N.B.; Afzal, S.; Singh, T.; Hussain, I. Zinc oxide nanoparticles: A review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *J. Mater. Sci.* **2017**, *53*, 185–201.
13. Mengel, K.; Kirkby, E.A. *Principles of Plant Nutrition*; 5th ed.; International Potash Institute, Springer Science Business Media: Worblaufen, Switzerland, 1987; pp. 505–596.
14. Fernández, V.; Brown, P.H. From plant surface to plant metabolism: The uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 289.
15. Liu, R.; Lal, R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Sci. Total Environ.* **2015**, *514*, 131–139.
16. Prasad, T.N.V.K.V.; Sudhakar, P.; Sreenivasulu, Y.; Latha, P.; Munaswamy, V.; Reddy, K.R.; Pradeep, T. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J. Plant Nutr.* **2012**, *35*, 905–927.
17. Kah, M.; Kookana, R.S.; Goggs, A.; Buchell, T.D. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13*, 677–684.
18. Rossi, L.; Fedonia, L.N.; Sharifan, H.; Ma, X.; Lombardini, L. Effects of foliar application of zinc sulfate and zinc nanoparticles in coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *135*, 160–166.
19. García-López, J.I.; Zavala-García, F.; Olivares-Sáenz, E.; Lira-Saldivar, R.; Barriga-Castro, E.; Ruiz-Torres, N.A.; Ramos-Cortez, E.; Vázquez-Alvarado, R.; Niño-Medina, G. Zinc oxide nanoparticles boosts phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum* L. during germination. *Agronomy* **2018**, *8*, 215.
20. Qados, A.M.S. Mechanism of nanosilicon-mediated alleviation of salinity stress in faba bean (*Vicia faba* L.) plants. *AJEA* **2015**, *7*, 78–95.
21. García-Gómez, C.; Obrador, A.; González, D.; Babina, M.; Dokres, M. Comparative effect of ZnONPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Sci. Total Environ.* **2017**, *589*, 11–24.
22. Nhan, L.V.; Ma, C.; Rui, Y.; Liu, S.; Li, X.; Xing, B. Phytotoxic mechanism of nanoparticles: Destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11618.
23. Laware, S.L.; Rankar, S. 2014. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth, flowering and seed productivity in onion. *Int. J. Carr. Microbiol. App. Sci.* **2014**, *3*, 874–881.
24. Mukherjee, A.; Sun, Y.; Meselias, E.; Tamez, C.; Bandyopadhyay, S.; Niu, G.; White, J.C.; Peralta-Videa, J.R.; Gardea-Torresdey, J.L. Differential toxicity of bare and hybrid ZnO nanoparticles in green pea (*Pisum sativum* L.): A life cycle study. *Front Plant Sci.* **2016**, *6*, 1242.
25. Singh, D.; Kumar, A. Impact of irrigation using water containing CuO and ZnO nanoparticles on *Spizacia olivacea* grown in soil media. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2016**, *97*, 548–553.
26. García-López, J.I.; Lira-Saldivar, R.H.; Zavala-García, F.; Olivares-Sáenz, E.; Niño-Medina, G.; Ruiz-Torres, N.A.; Méndez-Argüello, B.; Díaz-Barriga, E. Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of *Capsicum chinense*. *Toxicol. Environ. Chem.* **2018**, *100*, 560–572.
27. Raliya, R.; Tarafdar, J.C. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorus-mobilizing enzyme secretion and gum contents in Clusterbean (*Cyamopsis tetragoloba* L.). *Agric. Res.* **2013**, *2*, 48–57.
28. Torabian, S.; Zahedi, M.; Khoshgoftar, A.H. Effects of foliar spray of two kinds of zinc oxide on the growth and ion concentration of sunflower cultivars under salt stress. *J. Plant. Nutr.* **2016**, *39*, 172–180.
29. Kisan, B.; Shruithi, H.; Sharanagouda, H.; Revanappa, S.B.; Pramod, N.K. Effect of nano-zinc oxide on the leaf physical and nutritional quality of spinach. *Agrotechnology* **2015**, *5*, 132–134.
30. Steiner, A.A.A. Universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil* **1961**, *15*, 134–154.
31. López-Gómez, J.D.; Villegas-Torres, O.G.; Nava, H.S.; Rodríguez, M.A.; López, P.; Martínez, F. Yield and quality of habanero chili (*Capsicum chinense* Jacq.) by effect of nutritional regimen. *REMEXCA* **2017**, *8*, 1747–1758.
32. Zuverza-Mena, N.; Medina-Velo, I.; Barrios, A.C.; Tan, W.; Peralta-Videa, J.R.; Gardea-Torresdey, J.L. Copper nanoparticles/compounds impact agronomic and physiological parameters in cilantro (*Coriandrum sativum*). *Environ. Sci. Processes Impact.* **2015**, *17*, 1703–1703.

33. Simonovska, J.; Škerget, M.; Knez, Z.; Sebinoska, M.; Kavrakovski, Z.; Grozdanov, A.; Rafajlovska, V. Physicochemical characterization and bioactive compounds of stalk from hot fruits of *Capsicum annuum* L. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **2016**, *35*, 199–208.
34. Ellibox, W. Morphological changes associated with postharvest fruit deterioration and physical parameters for early determination of shelf life in *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience* **2015**, *50*, 1537–1541.
35. Pinedo-Guarnero, Z.; Hernández-Fuentes, A.D.; Ortega-Ortiz, H.; Benavides-Mendoza, A.; Cadenas-Piiego, G.; Juárez-Maldonado, A. Cu nanoparticles in hydrogels of chitosan-PVA affects the characteristics of post-harvest and bioactive compounds of jalapeño pepper. *Moléculas* **2017**, *22*, 926.
36. Commission Internationale De L'ecclairage. Cir 15: Technical Report: Colorimetry. Commission Internationale De L'ecclairage, 3rd ed.; CIE: Vienna, Austria, 2004.
37. ColorHexa. Color Encyclopedia: Information and Conversion. Computer Software. 2019. Available online: <https://www.colorhexa.com/> (accessed on 31 January 2019).
38. AOAC. Vitamin and other nutrient. In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*, 17th ed.; Hoerwitz, W., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2000.
39. Ryu, W.K.; Kim, H.W.; Kim, G.D.; Rhee, H.I. Rapid determination of capsaicinoids by colorimetric method. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 798–803.
40. Todd, P.H.; Benninger, M.G.; Biftu, T. Determination of pungency due to capsaicin by gas-liquid chromatography. *J. Food Sci.* **1977**, *42*, 660–665.
41. López-Contreras, J.J.; Zavala-García, E.; Urias-Orona, V.; Martínez-Ávila, G.C.G.; Rojas, R.; Nino-Medina, G. Chromatic, phenolic and antioxidant properties of sorghum bicolor genotypes. *Not. Bot. Horti Agrobot.* **2018**, *43*, 366–370.
42. Pavaní, K.; Divya, V.; Veena, I.; Aditya, M.; Devakinandan, G. Influence of bioengineered zinc nanoparticles and zinc metal on *Cicer arietinum* seedlings growth. *Asian J. Agric. Biol.* **2014**, *2*, 216–223.
43. De Rosa M.C.; Monreal, C.; Schnitzer, M.; Walsh, R.; Sultan, Y. Nanotechnology in fertilizers. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 91.
44. Wang, P.; Lombi, E.; Sun, S.; Scheckel, K.G.; Malysheva, A.; McKenna, B.A.; Menzies, N.W.; Zhao, F.-J.; Kopittke, P.M. Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environ. Sci. Nano* **2017**, *4*, 44.
45. Li, C.; Wang, P.; Lombi, E.; Cheng, M.; Tang, C.; Howard, D.L.; Kopittke, P.M. Absorption of foliar-applied Zn fertilizers by trichomes in soybean and tomato. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 2717–2729.
46. Reed, R.B.; Ladner, D.A.; Higgins, C.P.; Westerhoff, P.; Ranville, J.F. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 93–99.
47. Badger, M.R.; Price, G.D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1994**, *45*, 369–392.
48. Pullagurala, V.L.R.; Adisa, I.O.; Rawat, S.; Kalagara, S.; Hernandez-Viecas, J.A.; Peralta-Videa, J.R.; Gardea-Torresdey, J.L. ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant. Physiol. Biochem.* **2018**, *132*, 120–127.
49. Cakmak, I. Enrichment of cereal grains with zinc. Agronomic or genetic biofortification? *Plant. Soil.* **2008**, *302*, 1–17.
50. Moura, D.J.; Pérez, V.F.; Jacques, R.A.; Saffi, J. Heavy metal toxicity: Oxidative stress parameters and DNA repair. In *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; pp. 187–205.
51. Chaney, R. Zinc phytotoxicity. In *Zinc in Soils and Plants*; Robson, A.D., Ed.; Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherlands, 1993; pp.135–150.
52. Tirani, M.M.; Haghjou, M.M.; Suleiman, S.; Ismail, A. Comparative evaluation of zinc oxide effects on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) grown in different media. *J. Agric. Sci. Tech.* **2018**, *20*, 787–802.
53. Lin, D.; Xing, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* **2007**, *150*, 243–250.
54. Khanm, H.; Valighnavi, B.A.; Namratha, M.R.; Shankar, A.G. Nano zinc oxide boosting growth and yield in tomato: The rise of nano fertilizer era. *IJASR* **2017**, *7*, 197–206.
55. Wang, P.; Menzies, N.W.; Lombi, E.; McKenna, B.A.; Johannessen, B.; Glover, C.J.; Kappen, P.; Kopittke, P.M. Fate of ZnO nanoparticles in soils and cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 13822–13830.

56. Eichert, T.; Kurtz, A.; Steiner, U.; Goldbach, H.E. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water suspended nanoparticles. *Physiol. Plant.* **2008**, *124*, 151–160.
57. Eichert, T.; Goldbach, H.E. Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and stomatous leaf surfaces—further evidence for a stomatal pathway. *Physiol. Plant.* **2008**, *132*, 491–502.
58. Avellan, A.; Yun, J.; Zhang, Y.; Spielman-Sun, R.; Unrine, J.M.; Thieme, J.; Lowry, G.V. Nanoparticle size and coating chemistry control foliar uptake pathways, translocation and leaf-to-rhizosphere transport in wheat. *ACS Nano*. **2019**, *13*, 5291–5305.
59. Larue, C.; Castillo-Michel, H.; Sobanska, S.; Trcera, N.; Sorieul, S.; Cécillon, L.; Sarret, G. Fate of pristine TiO₂ nanoparticles and aged paint-containing TiO₂ nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *273*, 17–26.
60. Pérez-de-Laque, A. Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture? *Frost. Environ. Sci.* **2017**, *5*, 12.
61. Barokó, J.U.A.N.; Poschenrieder, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *J. Plant. Nutr.* **1990**, *13*, 1–37.
62. Kim, S.; Ha, T.Y.; Park, J. Characteristics of pigment composition and colour value by the difference of harvesting times in Korean red pepper varieties (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Food Sci. Tech.* **2008**, *43*, 915–920.
63. Lightbourn, G.J.; Griesbach, R.J.; Novotny, J.A.; Clevidence, B.A.; Rao, D.D.; Stommel, J.R. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *J. Hered.* **2008**, *99*, 105–111.
64. Aloni, B.; Karni, L.; Deventurero, G.; Turhan, E.; Aktas, H. Changes in ascorbic acid concentration, ascorbate oxidase activity, and apoplastic pH in relation to fruit development in pepper (*Capsicum annuum* L.) and the occurrence of blossom-end rot. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **2008**, *83*, 100–105.
65. Park, S.; Jeong, W.Y.; Lee, J.H.; Kim, Y.H.; Jeong, S.W.; Kim, G.S.; Bae, D.W.; Lim, C.S.; Jin, J.S.; Lee, S.J.; et al. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2012**, *130*, 981–985.
66. Wang, F.; Lombi, E.; Zhao, F.J.; Kopittke, P.M. Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21*, 699–712.
67. Pérez-Labrada, F.; López-Vargas, E.R.; Ortega-Ortiz, H.; Cadenas-Pliego, G.; Benavides-Mendoza, A.; Juárez-Maldonado, A. Responses of tomato plants under saline stress to foliar application of copper nanoparticles. *Plants* **2019**, *8*, 151.
68. Yang, J.; Cao, W.; Rui, Y. Interactions between nanoparticles and plants: Phytotoxicity and defense mechanisms. *J. Plant. Interact.* **2017**, *12*, 158–169.
69. Sandmann, G.; Albrecht, M.; Schnurr, G.; Knörzer, O.; Böger, P. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 230–236.
70. Wang, S.Y.; Lin, S. Compost as soil supplement enhanced plant growth and fruit quality of strawberry. *J. Plant. Nutr.* **2012**, *25*, 2243–2259.
71. Gupta, P.K.; Gupta, A.K. Studies of PGR and Micronutrient mixtures on vitamin 'C' content in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill) products. *Indian J. Hort.* **2004**, *61*, 102–103.
72. Yogeramam, N.; Greenham, D.W.P. The application of foliar sprays containing N, Mg, Zn and B to apple trees. I. Effect on fruit set and cropping. *J. Hort. Sci.* **1982**, *57*, 151–154.
73. Welch, R.M.; Webb, M.J.; Loneragan, J.F. Zinc in membrane function and its role in phosphorus toxicity. In Proceedings of the 9th Plant Nutrition Colloquium, Coventry, UK, 22–27 August 1982; pp. 710–715.
74. Weiss, E.A. *Spice Crops*; CABI Publishing International: New York, NY, USA, 2002; p. 411.
75. Antonios, G.F.; Lobel, L.; Kochhar, T.; Jarret, R. Antioxidants in *Capsicum chinense*: Variation among countries of origin. *J. Environ. Sci. Health.* **2009**, *6*, 621–626.
76. Sosan, A.; Sviridzenko, D.; Stralkova, D.; Tsurkina, K.; Smolich, I.; Lawson, S.; Golovko, V.; Anderson, D.; Sokołk, A.; Colbeck, I.; et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* **2016**, *85*, 245–257.
77. Castro-Concha, L.A.; Tuyub-Che, J.; Moo-Mukul, A.; Vaquez-Flota, F.A.; Miranda-Ham, L. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero pepper) at different stages of ripening. *Sci. World J.* **2014**. doi:10.1155/2014/809073

78. Campos, M.R.S.; Gómez, K.R.; Ordoñez, Y.M.; Ancona, D.B. Polyphenols, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruit. *Food Nutr. Sci.* **2013**, *4*, 47–54.
79. Ma, H.; Williams, P.L.; Diamond, S.A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles—A review. *Environ. Pollut.* **2013**, *172*, 76–85.
80. Lopez-Moreno, M.L.; De La Rosa, G.; Hernandez-Viezcas, J.A.; Castillo-Michel, H.; Botez, C.E.; Peralta-Videa, J.R.; GardeaTorresdey, J.L. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ NPs on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 7315–7320.
81. Ghosh, M.; Jana, A.; Sinha, S.; Jothiramajayam, M.; Nag, A.; Chakraborty, A.; Mukherjee, A.; Mukherjee, A. Effects of ZnO nanoparticles in plants: Cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2016**, *807*, 25–32.
82. Kouhl, S.M.M.; Lahouti, M.; Ganjeali, A.; Entezari, M.H. Comparative effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk particles, and Zn²⁺ on *Brassica napus* after long-term exposure: Changes in growth, biochemical compounds, antioxidant enzyme activities, and Zn bioaccumulation. *Water Air Soil Pollut.* **2015**, *226*, 364.
83. García-Gómez, C.; Obrador, A.; González, D.; Babín, M.; Fernández, M.D. 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.* **2018**, *644*, 770–780.
84. Zafar, H.; Ali, A.; Ali, J.S.; Haq, I.U.; Zia, M. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: Growth dynamics and antioxidative response. *Front. Plant. Sci.* **2016**, *7*, 535.
85. Mahendra, S.; Zhu, H.; Colvin, V.L.; Alvarez, P.J. Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 9424–9430.
86. Bhumí, G.; Ratna, N.; Savithramma, N. Screening of zinc oxide nanoparticles for cell proliferation synthesized. *Int J. Drug Del. Res.* **2014**, *6*, 0975–9344.
87. Sora, G.T.S.; Haminiuk, C.W.L.; Da Silva, M.V.; Zieliński, A.A.F.; Gonçalves, G.A.; Bracht, A.; Peralta, R.M. A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and in vitro antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: An application of chemometrics. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 8086–8094.
88. Alvarez-Parrilla, E.; De la Rosa, L.A.; Amarowicz, R.; Shahidi, F. Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and serrano peppers. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 163–173.
89. Parry, A.D.; Tiller, S.A.; Edwards, R. The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant. Physiol.* **1994**, *106*, 106–196.
90. Ghiassi-Tarzja, B.; Gharachorloo, M.; Baharinia, M.; Mortazavi, S.A. The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iran J. Pharm. Res.* **2012**, *11*, 1137–1143.
91. Zare, M.; Namratha, K.; Byrappa, K.; Surendra, D.M.; Yallappa, S.; Hungund, B. Surfactant assisted solvothermal synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antimicrobial and antioxidant properties. *J. Mater. Sci. Technol.* **2018**, *34*, 1035–1043.

