



EFFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE ZnO EN VARIABLES FOTOSINTÉTICAS Y ESTRÉS OXIDATIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

EFFECT OF ZnO PARTICLE SIZE ON PHOTOSYNTHETIC VARIABLES AND OXIDATIVE STRESS OF LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)

Abigail Mendieta-Morales¹, Hilda Araceli Zavaleta-Mancera^{2*}, Ma. de Lourdes Catalina Arévalo-Galarza¹, Fernando Carlos Gómez-Merino³, Adriana Delgado-Alvarado⁴ y Victor Manuel Rojas-Salazar⁵

¹Colegio de Postgraduados (CP), Posgrado Recursos Genético y Productividad-Fisiología Vegetal, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ²CP, Programa de Posgrado en Botánica, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ³CP, Posgrado de Edafología, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ⁴CP, Campus Puebla, Posgrado de Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, San Pedro Cholula, Puebla, México. ⁵Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UBIPRO, Laboratorio de Gestión del Conocimiento, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia (arazavaleta@colpos.mx)

RESUMEN

Las propiedades fisicoquímicas del ZnO varían significativamente con el tamaño de partícula, lo que influye en su comportamiento biológico en plantas. En esta investigación se evaluó el efecto de nanopartículas (NPs <100 nm) de 79.38 ± 2.72 nm y submicropartículas (SMPs ≥ 100 nm y < 1 µm) de 227.15 ± 6.80 nm de ZnO, en concentraciones crecientes sobre la respuesta fisiológica, bioquímica y anatómico-estructural en lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivada en hidroponía. Plántulas de lechuga var. Grazion fueron cultivadas en solución nutritiva de Hoagland modificada + NPs ZnO y SMPs ZnO (1, 10 y 100 mg L⁻¹) durante tres semanas. Previamente, se realizó la caracterización de las partículas utilizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Las variables medidas fueron crecimiento, verdor relativo, pigmentos fotosintéticos, eficiencia máxima del fotosistema II (PSII), proteínas solubles y enzimas antioxidantes (SOD, CAT y APX). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y los datos fueron analizados con ANDEVA y prueba de comparación de medias Tukey-DSH. Las NPs fueron cuasiesféricas, mientras que las SMPs mostraron formas poliédricas y en varilla; ambas presentaron estructura cristalina tipo wurtzita. A 1 mg L⁻¹, las SMPs indujeron un efecto hormético, aumentando la biomasa de raíz, mientras que las NPs no estimularon el crecimiento. A 10 mg L⁻¹, las SMPs redujeron el número de hojas, contenido de pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b* y *x+c*: ~25 %), y la biomasa aérea. A 100 mg L⁻¹, ambas partículas causaron efectos tóxicos tales como disminución de la concentración de pigmentos, proteínas solubles, actividad de SOD y CAT, y eficiencia del PSII (~16 % con SMPs). Los resultados muestran efectos tamaño-dosis dependientes, con las SMPs actuando como promotoras a baja concentración y tóxicas a mayores dosis. Este estudio subraya la importancia de considerar el tamaño de las partículas para un uso agrícola responsable de nanomateriales.

Palabras clave: *Lactuca sativa*, crecimiento, estrés oxidativo, fotosíntesis, hormesis.

SUMMARY

The physicochemical properties of ZnO vary significantly with particle size, influencing its biological behavior in plants. In this research, the effects of ZnO nanoparticles (NPs <100 nm) of 79.38 ± 2.72 nm and submicroparticles (SMPs ≥ 100 nm < 1 µm) of 227.15 ± 6.80 nm were evaluated at increasing concentrations on the physiological, biochemical and anatomical-structural response in lettuce grown in hydroponics. Lettuce seedlings (*Lactuca sativa*

L.) cv. Grazion were grown in modified Hoagland nutrient solution + ZnO NPs and ZnO SMPs (1, 10 and 100 mg L⁻¹) for three weeks. The particles used were previously characterized by transmission electron microscopy (TEM). The variables measured were growth, relative greenness, photosynthetic pigments, maximum efficiency of photosystem II (PSII), soluble proteins and antioxidant enzymes (SOD, CAT and APX). A completely randomized experimental design was used and the data were analyzed with ANOVA and Tukey-HSD mean comparison test. NPs were quasi-spherical, while SMPs showed polyhedral and rod shapes; both presented a wurtzite-type crystalline structure. At 1 mg L⁻¹, SMPs induced a hormetic effect, increasing root biomass, whereas NPs did not stimulate growth. At 10 mg L⁻¹, SMPs reduced leaf number, photosynthetic pigment content (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b* and *x+c*: ~25 %), and aboveground biomass. At 100 mg L⁻¹, both particles caused toxic effects such as decreased concentrations of pigments, soluble proteins, SOD and CAT activity, and PSII efficiency (~16 % with SMPs). Results show size-dose dependent effects, with SMPs acting as promoters at low concentrations and toxic at higher doses. This study underscores the importance of considering particle size for responsible agricultural use of nanomaterials.

Index words: *Lactuca sativa*, growth, hormesis, oxidative stress, photosynthesis.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología representa una industria global multimillonaria con aplicaciones en disciplinas como la ingeniería, la física, la química y las ciencias biológicas (Mendes *et al.*, 2024). Dentro de los nanomateriales (NMs), las nanopartículas (NPs, 1.0 - 100 nm) de óxidos metálicos han cobrado especial atención debido a sus propiedades físicas y químicas únicas; entre ellas, las de óxido de zinc (ZnO) presentan características ópticas, eléctricas, antibacterianas y semiconductoras que las hacen versátiles para múltiples aplicaciones (Abdullah *et al.*, 2024; Sirelkhatim *et al.*, 2015). En este contexto, la agricultura moderna ha comenzado a incorporar NPs metálicas por su potencial para mejorar los procesos fisiológicos de las plantas y la calidad de los cultivos (Faizan *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2022).

El zinc (Zn) es un micronutriente esencial para las plantas. Este elemento activa enzimas como la superóxido dismutasa y las ADN y ARN polimerasas, regula la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y la concentración de CO_2 en el mesófilo, además de intervenir en la síntesis de clorofila, triptófano y hormonas vegetales, siendo fundamental para el crecimiento vegetal (Gupta *et al.*, 2016); sin embargo, la aplicación de NPs de ZnO en plantas cultivadas ha despertado inquietudes sobre su acumulación en tejidos vegetales y su potencial impacto en la salud humana a través de la cadena alimentaria (Kim *et al.*, 2024). La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es un modelo vegetal ampliamente utilizado por su ciclo de vida corto, alta tasa de crecimiento y adaptabilidad a sistemas hidropónicos, es una especie ideal para evaluar los efectos fisiológicos y bioquímicos de los nanomateriales.

Las NPs de ZnO han demostrado ser muy eficientes sobre el crecimiento vegetal; por ejemplo, en lechuga, la aplicación de 10 mg kg^{-1} de NPs ZnO al suelo incrementó la biomasa fresca y la tasa fotosintética neta (Xu *et al.*, 2018); en brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), en concentraciones de 100 y $200 \mu\text{g L}^{-1}$ promovieron la germinación y el crecimiento vegetativo (Awan *et al.*, 2021), y, en arroz (*Oryza sativa* L.), la aplicación de 10 mg L^{-1} favoreció el desarrollo de las plantas (Afzal *et al.*, 2022). En *L. sativa*, Gao *et al.* (2022) reportaron que la aplicación de 2.5 mg L^{-1} aumentó en 34 % la biomasa fresca de plántulas y en 37 % la relación raíz-tallo, junto con una mejora en el contenido de clorofila; sin embargo, también se han documentado efectos fitotóxicos; en *O. sativa*; dosis de 50, 100 y 500 mg L^{-1} redujeron significativamente el crecimiento (Afzal *et al.*, 2022); en *Zea mays*, 400 mg kg^{-1} provocaron efectos negativos en la biomasa (Zhao *et al.*, 2015); y en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), la exposición a 300 mg L^{-1} disminuyó la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de clorofila y los fotosistemas (PSI y PSII) (Wang *et al.*, 2016).

A pesar de la creciente aplicación de NPs de ZnO en sistemas agrícolas, aún se desconoce la manera en que influyen las propiedades como el tamaño y la forma de las partículas en su desempeño fisiológico y toxicológico en cultivos hortícolas. Son escasos los estudios que han abordado de forma comparativa y sistemática los efectos de diferentes tamaños de partículas de ZnO en condiciones como las del cultivo hidropónico. En particular, el tamaño de partícula es un factor determinante en la interacción de los nanomateriales con los sistemas biológicos, ya que influye en su absorción, movilidad, acumulación y toxicidad. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de dos tamaños de partículas de óxido de

zinc (ZnO): nanopartículas ($<100 \text{ nm}$) y submicropartículas ($\geq 100 \text{ nm}$ y $< 1.0 \mu\text{m}$), aplicadas en concentraciones crecientes (1 , 10 y 100 mg L^{-1}), sobre la respuesta fisiológica, bioquímica, anatómica y estructural de lechuga cultivada en sistema hidropónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las partículas y caracterización

Las NPs ZnO de grado analítico en polvo fueron obtenidas de Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, EE. UU.), en tanto que las SMPs ZnO grado farmacéutico en polvo fueron adquiridas en la Farmacia París, México. Las soluciones stock se prepararon disolviendo 0.1 g de NPs y SMPs de ZnO en 1 mL de acetona y etanol, respectivamente. Tras una dilución 1:100, se colocaron $4 \mu\text{L}$ de suspensión en rejillas de cobre de malla 400, con Formvar y carbón (Pelco®-Ted Pella, Inc., Redding, California, EE. UU.). La forma y tamaño de las partículas se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) (Tecnai 2 Spirit, Thermo Fisher-Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU. a 120 keV , y se midieron 300 partículas con el software ImageTool (UTHSCSA Ver. 2.0, US, 1997).

Material vegetal y cultivo hidropónico

Se utilizaron plántulas de lechuga tipo Batavia, variedad Grazion de tres semanas de edad, adquiridas comercialmente en Agrosistemas Controlados, S. A. de C. V. (Texcoco, México). Los experimentos se realizaron en condiciones de invernadero en Montecillo, Estado de México, México. Se establecieron tres experimentos durante los periodos primavera-verano 2023 y 2024, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el día y $15 \pm 2^\circ\text{C}$ durante la noche, con una humedad relativa (HR) del 50 % y fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad. Plántulas con cinco hojas extendidas fueron cultivadas en un sistema hidropónico en cubetas de 6 L de capacidad. La solución nutritiva fue Hoagland y Arnon (1950) modificada (mg L^{-1}): 116.323 NO_3^- , $15.247 \text{ H}_2\text{PO}_4^-$, 25.819 SO_4^{2-} , 121.02 K^+ , 132.71 Ca^{2+} y 30 Mg^{2+} . Los micronutrientes suministrados fueron (mg L^{-1}): 3.632 Fe , 2.368 Mn , 1.184 Zn , 2.368 Cu , 1.184 B y 0.095 Mo . Las concentraciones de la solución nutritiva se ajustaron a diferentes conductividades eléctricas (CE) de 0.5, 0.7 y 1.0 dS m^{-1} cada semana. El sistema fue aireado continuamente mediante bombas de acuario (modelo ACO-002, 35 W , 40 L min^{-1} , 110 V , España) para evitar la sedimentación de las partículas y favorecer la oxigenación radicular. La solución nutritiva con los tratamientos de NPs y SMPs fue renovada cada 8 días, y el pH fue ajustado diariamente (5.5-6.0) con H_2SO_4 , 98 % de pureza, grado técnico.

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar con siete tratamientos. Biomasa fresca del vástago (BFV), biomasa seca del vástago (BSV), relación vástago/raíz (BFR), biomasa seca de la raíz (BSR) y relación raíz/vástago (R/V), con siete repeticiones por tratamiento; número total de hojas y producción de hojas por día, con ocho repeticiones; verdor relativo (SPAD), clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides+xantofilas (*x+c*) clorofila total (Chl *a+b*) y relación clorofila total/carotenoides+xantofilas (Chl *a+b/x+c*), con seis repeticiones; eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm), con cinco repeticiones, variables bioquímicas con cuatro repeticiones, cada uno con tres réplicas y cada réplica con cuatro sub-réplicas. La unidad experimental fue una planta cultivada en una cubeta plástica. Los tratamientos fueron T1: control (sin aplicación de ZnO); T2-T4, NPs ZnO a 1, 10 y 100 mg L⁻¹; T5-T7, SMPs ZnO a 1, 10 y 100 mg L⁻¹.

Variables de crecimiento y morfología

Las biomásas frescas de vástago (BFV) y de raíz (BFR) se midieron pesando por separado el vástago (tallo + hojas) y la raíz en una balanza de precisión (ALC, Acculab, New York, EE. UU.); posteriormente, el vástago y raíz frescos se colocaron en bolsas de papel y se secaron en una estufa a 60° C durante 5 d hasta obtener peso constante, luego se pesaron obteniendo la biomasa seca de vástago (BSV) y la biomasa seca de raíz (BSR), y a partir de estos valores se obtuvo la relación de raíz/vástago (R/V). Los daños morfológicos en el vástago y en la raíz se describieron conforme se observaba el efecto de los tratamientos.

Variables fotosintéticas

Pigmentos fotosintéticos

Discos de 0.5 cm de diámetro de la parte media de la hoja fueron colocados en tubos Eppendorf con 2 mL de acetona 80 %, y se dejaron reposar en oscuridad durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, las muestras fueron maceradas, se colocaron en un tubo de ensayo de 10 mL y se aforó con acetona a un volumen final de 3 mL, los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 3200 g (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania). La concentración de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), xantofilas + carotenos (*x+c*) fueron medidos en un espectrofotómetro UV/Vis (Modelo GeneSystem 10 UV, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EE. UU.), de acuerdo con Lichtenthaler (1987).

Eficiencia del fotosistema II (PSII)

Las macetas fueron sometidas a un periodo de oscuridad de 10 min y, posteriormente, la fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) fue medida en la séptima hoja completamente expandida con un aparato Fluor Cam P-800 (Photosystem Instrument PSI, Drasov, República Checa).

Variables bioquímicas

La extracción se realizó macerando 100 mg de tejido conservadas a -60 °C en 1 mL de amortiguador de extracción (fosfato de potasio 0.05 M a pH 7.5, EDTA 1.3 mM y PVPP 2 %). Los extractos se sometieron tres veces durante 2 min cada una a un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner, modelo AS5150B, Buenos Aires, Argentina), y se centrifugaron a 12,000 g en una centrifuga (Hettich® MIKRO 200/200R, Tuttlingen, Alemania) durante 20 min a 4 °C.

Proteína soluble

La concentración de las proteínas solubles se determinó según Bradford (1976), con una mezcla de reacción de 50 µL del extracto enzimático y 200 µL del reactivo de Bradford (Sigma Aldrich, Alemania).

Actividad de enzimas antioxidantes

La actividad SOD (EC 1.15.1.1) se determinó de acuerdo con el protocolo propuesto por Dhindsa *et al.* (1981) con modificaciones. Se modificó el volumen de extracto (20 µL) y el amortiguador de fosfato de sodio (258 µL) con la finalidad de determinar los volúmenes de reacción. La actividad CAT (EC 1.11.1.6) fue medida según Aebi (1984), con modificaciones (30 µL de extracto vegetal y 240 µL de amortiguador de fosfato de potasio) y del buffer de fosfato de sodio (258 µL) y siguiendo la cinética de consumo del H₂O₂ a 240 nm durante 3 min a 30 °C. La actividad de APX (EC 1.11.1.11) fue calculada conforme a Nakano y Asada (1987) con modificaciones (25 µL de extracto vegetal y 245 µL de amortiguador de fosfato de potasio), los cambios de absorbancia fueron medidos a una longitud de onda de 290 nm por 3 min a 25 °C.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y las diferencias entre medias de los tratamientos con Tukey-DSH con $P \leq 0.05$. Se usó el paquete estadístico SAS v9.4 (Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, North Carolina, EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las partículas

De acuerdo con el estudio morfométrico realizado con MET, las NPs ZnO obtenidas de la marca Sigma-Aldrich fueron partículas con un tamaño promedio de 79.38 ± 2.72 nm, con un intervalo de tamaño más abundante entre 40 y 60 nm. En contraste, las partículas de ZnO presentaron un tamaño promedio de 227.15 nm y el tamaño más abundante fue de 150 a 200 nm, por lo que se les denominó submicropartículas (SMPs) por considerarse mayores de 100 nm y menores de 1 μm , siguiendo los criterios de la ISO (2015) y McCully *et al.* (2018). La morfología de las NPs fue cuasiesférica, mientras que las SMPs presentaron formas irregulares y alargadas (Figura 1). Esta distinción es esencial para evitar ambigüedades, que comúnmente se encuentran en la literatura científica. Los resultados aquí encontrados de morfología de las partículas concuerdan con la morfología reportada por Parihar *et al.* (2018). El microanálisis con MEB-EDS corroboró la composición química elemental de las NPs y SMPs de ZnO, encontrándose Zn y O en las muestras, la presencia de C en el espectro correspondió a la cinta usada para adherir las partículas (Figura 1).

Crecimiento y morfología de lechuga

Se observaron efectos dependientes del tamaño de partícula y la concentración en el crecimiento y morfología de *L. sativa*. El efecto en el crecimiento de la parte aérea, medido como la BFV, presentó una reducción del 58 % en las plantas tratadas con 10 mg NPs ZnO L^{-1} y del 53 % en aquellas que recibieron 10 mg SMPs ZnO L^{-1} , en ambos casos, con respecto al testigo. Para ambos tipos de partículas, al aumentar la dosis (100 mg L^{-1}) la reducción en BFV fue de 90 % con respecto al testigo (Cuadro 1); en contraste, el efecto de las NPs y las SMPs en la BSV fue diferencial: las NPs ZnO, en la concentración de 10 mg L^{-1} , redujeron esta variable en 55 % y las SMPs en 31 %, observándose la máxima reducción (70 y 71 %) con 100 mg L^{-1} en ambas partículas con respecto al testigo (Cuadro 1).

El efecto de los tratamientos en el crecimiento en la raíz, medido como BFR y BSR, se reflejó en una disminución en todas las concentraciones, excepto con las SMPs a 1 mg L^{-1} , las cuales promovieron en un 21 y 36 %, respectivamente. Este tipo de respuesta, de estimulación a bajas dosis y toxicidad a concentraciones elevadas, sugiere un comportamiento tipo hormesis, según la definición de Hoffmann (2009), quien la describe como una respuesta bifásica, en la que la exposición a factores estresantes genera una respuesta beneficiosa para el organismo en bajas dosis y negativa en dosis altas. Este

comportamiento hormético ha sido reportado para plantas expuestas a NPs metálicas (Rai *et al.*, 2023).

La relación vástago/raíz (V/R) debe ajustarse para que las raíces suministren suficiente agua para la transpiración del vástago y el vástago proporcione la energía mediante la fotosíntesis. La relación debe ser equilibrada para el buen crecimiento. Ambas partículas afectaron de manera similar esta relación, con algunas excepciones. La lechuga, en presencia de NPs y SMPs a 10 mg L^{-1} , presentó valores superiores a 1, 4.13 y 5.08 respectivamente, similares al control (6.09), indicando una gran biomasa aérea que para esta hortaliza de hoja es deseable. Con 10 mg de NPs ZnO L^{-1} se observó una reducción de 15 % y en las SMPs, en la misma concentración, la reducción fue del 5 % con respecto al testigo (Cuadro 1). En contraste, 100 mg L^{-1} de NPs y SMPs ZnO afectaron esta razón, reduciendo los valores a 2.85 y 2.45 (Cuadro 1). En mayores concentraciones ambos tamaños de partícula afectaron el desarrollo del vástago y la raíz (Figura 2).

La aplicación de 100 mg de NPs y 100 mg de SMPs ZnO L^{-1} provocó en mayor medida la reducción del número de hojas (37 y 44 %) (Cuadro 1). En esta última concentración, las hojas fueron pequeñas, ásperas, deformes y con clorosis severa y manchas. El ápice principal de crecimiento se necrosó a partir de la segunda semana de tratamiento, lo que impidió la formación de hojas nuevas. Las raíces fueron pequeñas con respecto al vástago (V/R, NPs-2.85 y SMPs-2.25), también se observó una coloración marrón intensa y un menor número de raíces laterales (Figura 2). Estudios previos, reportaron efectos positivos en concentraciones bajas de NPs. Xu *et al.* (2018) observaron un aumento del 6.2 % en la BF con 10 mg L^{-1} de NPs de ZnO (90 ± 10 nm). Gao *et al.* (2022) documentaron un aumento del 34 % en la BFV y del 37 % en la BFR en plantas de *L. sativa* tratadas con 2.5 mg L^{-1} de NPs. Awan *et al.* (2021) reportaron incremento en número de hojas, área foliar y altura en *Brassica oleracea* var. *italica* con 800 μg L^{-1} de NPs de ZnO (24 nm); de igual forma, Mardi *et al.* (2022) registraron un aumento progresivo en la relación raíz/brote en *Nicotiana tabacum* L. con 50 y 200 mg L^{-1} . En contraste, Nair y Chung (2017) reportaron efectos tóxicos en *Arabidopsis thaliana* con 50-200 mg L^{-1} de NPs de ZnO, incluyendo la reducción del tamaño foliar, clorosis e inhibición del desarrollo de raíces laterales. Estos antecedentes sugieren que el beneficio o toxicidad es dependiente de la especie, dosis, sistema de cultivo, características del nanomaterial, agregación, disolución y transporte.

Variables fotosintéticas y bioquímicas

Los pigmentos fotosintéticos constituyen una variable indirecta que indica la salud del aparato fotosintético y la

capacidad productiva de la planta. Desde la aplicación de 10 mg L⁻¹ de NPs ZnO y SMPs ZnO se promovió una reducción (25 %) en la concentración de Chl *a* hasta un 75 % con 100 mg L⁻¹ respecto al testigo. La Chl *b* observó una tendencia similar a la Chl *a* con una reducción (68 %) con 100 mg NPs ZnO L⁻¹ y de 72 % con SMPs ZnO L⁻¹ (Cuadro 2).

La concentración de *x+c*, pigmentos protectores del foto-daño, también se redujeron en 58 y en 63 % con la dosis de 100 mg L⁻¹ de NPs y SMPs (Cuadro 2). El cociente Chl *a+b*/*x+c*, que indica el verdor de la hoja, mostró una disminución, solo con 100 mg L⁻¹ ZnO para ambos tamaños de partícula. Las NPs no modificaron la eficiencia del PSII medida como *Fv/Fm*, con ninguna concentración, contrariamente las

SMPs redujeron el *Fv/Fm* en 16 % con 100 mg L⁻¹ (Cuadro 2).

Se ha indicado que la endocitosis de NPs esféricas es más rápida y eficiente que la de NPs con morfologías alargadas, como varillas o fibras (Gatoo *et al.*, 2014). La forma alargada de las SMPs podría haber dificultado su internalización en la raíz, lo que favoreció la acumulación de estas en la rizósfera, afectando la absorción de agua y nutrientes (Mardi *et al.*, 2022; Sirelkhatim *et al.*, 2015). Otra hipótesis sugiere la liberación de iones Zn²⁺ desde la rizósfera hacia el interior de la raíz y su traslocación al vástago, ocasionando estrés oxidativo y reducción en la concentración de los pigmentos fotosintéticos y

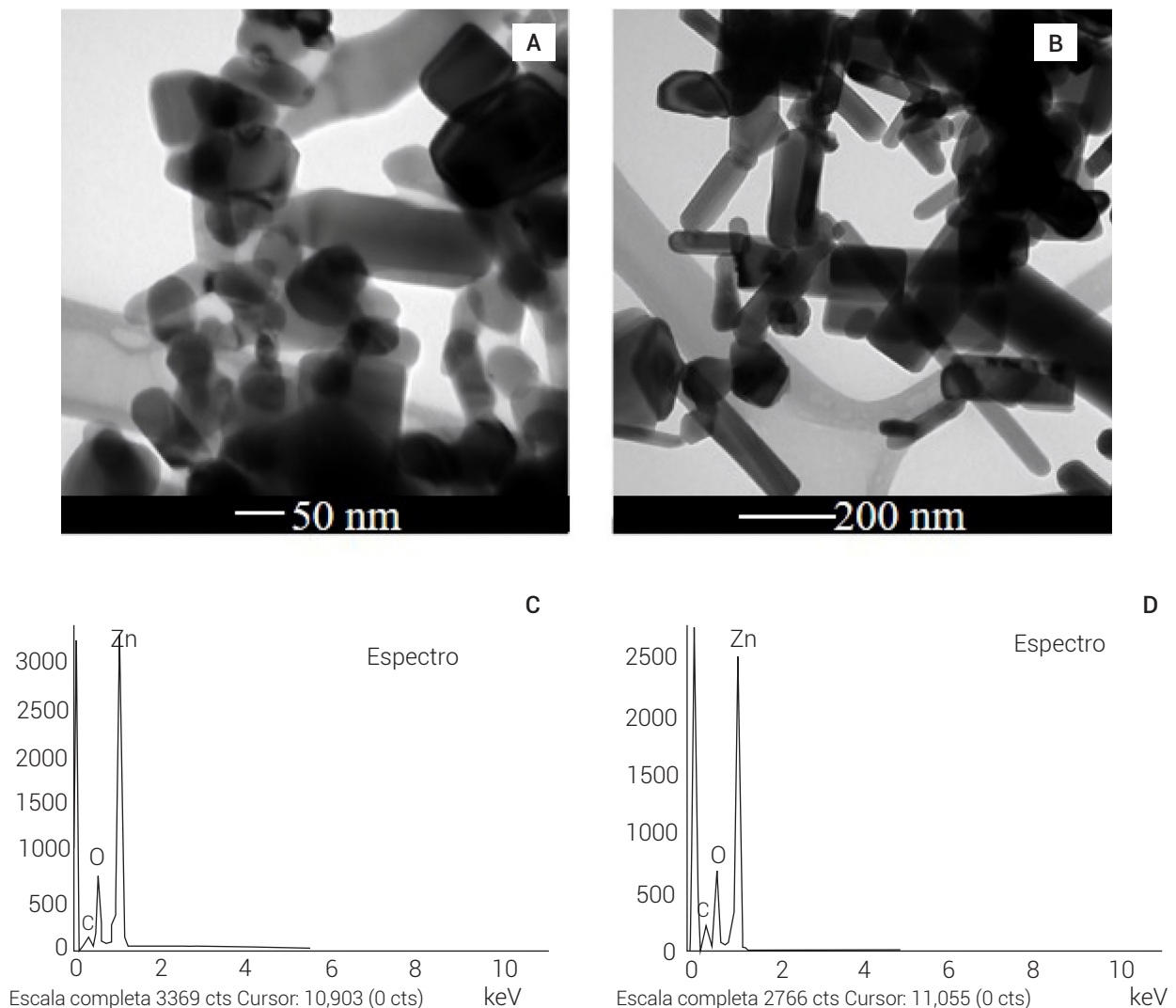


Figura 1. Análisis morfométrico de nanopartículas (NPs) de ZnO (A, C) y submicropartículas (SMPs) de ZnO (B, D). Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) (A-B). Espectros de EDS (C y D). El microscopio electrónico de barrido (MEB) JSM-6390LV (JEOL, Japón) operado a 10 keV y un EDS (INCA-Oxford, EE. UU.) acoplado al MEB. Las imágenes de MET se obtuvieron con un Tecnai 2 Spirit (ThermoFisher-Scientific, EE. UU.) a 120 keV.

Cuadro 1. Efecto de las NPs ZnO y SMPs ZnO en las variables de crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. Grazion en cultivo hidropónico.

Tratamientos (1, 10, 100 mg L ⁻¹)	Número de hojas	Biomasa fresca de vástago (BFV, g)	Biomasa seca de vástago (BSV, g)	Biomasa fresca de raíz (BFR, g)	Biomasa seca de raíz (BSR, g)	Relación biomasa seca raíz/vástago (R/V)
0	19.37 ± 0.42 ab	39.93 ± 2.90 a	1.70 ± 0.10 a	7.57 ± 0.49 b	0.29 ± 0.03 bc	6.09 ± 0.55 a
NPs1	17.88 ± 0.30 bc	33.74 ± 1.55 a	1.68 ± 0.07 a	8.49 ± 0.23 ab	0.34 ± 0.01 ab	5.03 ± 0.24 ab
NPs10	16.50 ± 0.65 c	16.83 ± 1.55 b	0.77 ± 0.10 c	3.01 ± 0.18 c	0.19 ± 0.01 de	4.13 ± 0.43 bc
NPs100	12.12 ± 0.35 d	3.80 ± 0.22 c	0.40 ± 0.01 d	1.22 ± 0.07 d	0.14 ± 0.01 f	2.85 ± 0.10 cd
SMPs1	21.13 ± 0.69 a	41.44 ± 1.47 a	2.06 ± 0.10 a	9.14 ± 0.53 a	0.40 ± 0.03 a	5.27 ± 0.21 ab
SMPs10	18.38 ± 0.50 bc	18.92 ± 1.35 b	1.18 ± 0.12 b	3.69 ± 0.18 c	0.23 ± 0.01 cd	5.08 ± 0.38 ab
SMPs100	10.88 ± 0.75 d	4.09 ± 0.31 c	0.38 ± 0.02 d	1.22 ± 0.07 d	0.16 ± 0.01 ef	2.45 ± 0.19 d

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Número de hojas (n = 8). En BFV, BSV, BFR, BSR, R/V (n = 7). Los datos representan la media ± EE; (Tukey, P ≤ 0,05).

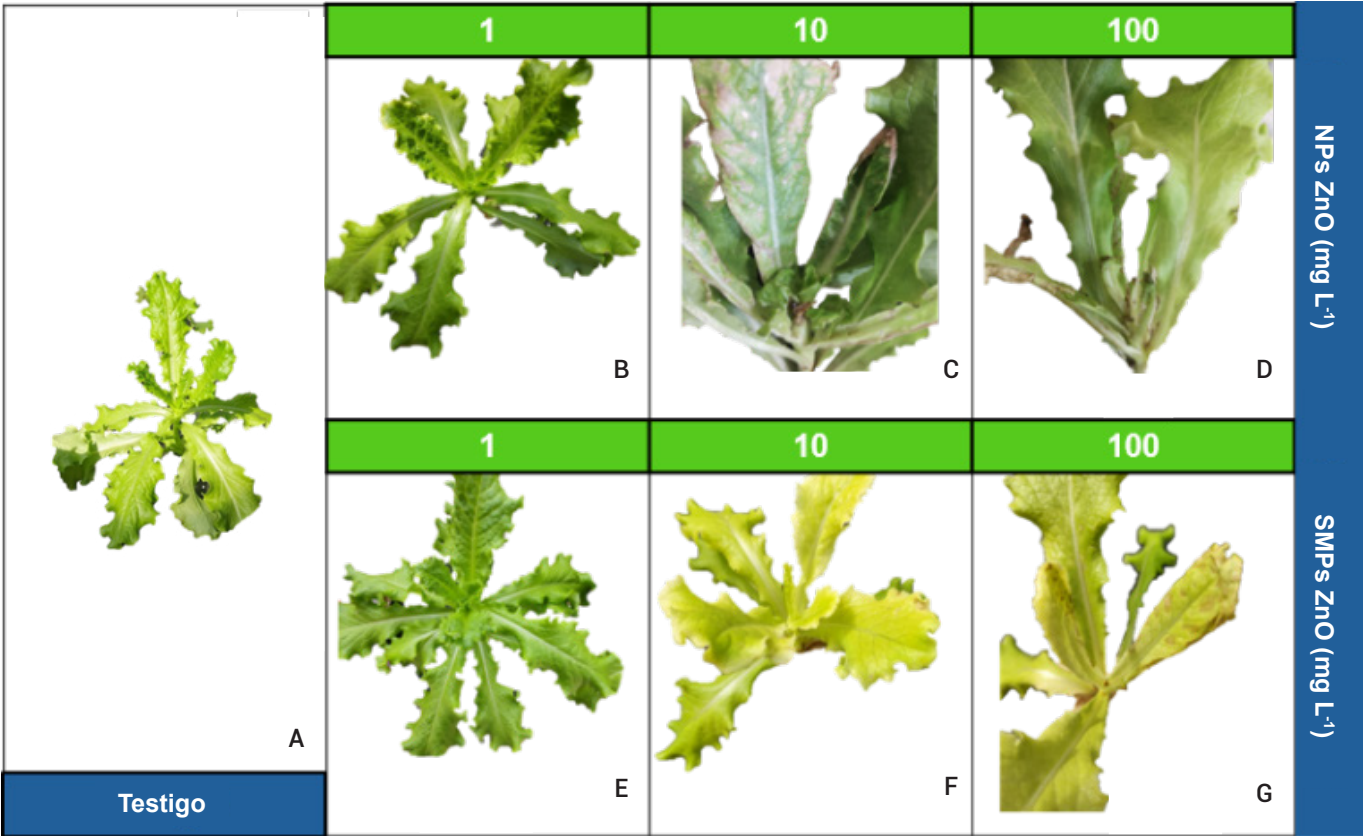


Figura 2. Efecto de las nanopartículas (NPs) (B-D) y submicropartículas (SMPs) (E-G) de ZnO en los daños morfológicos de lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. Grazion a los 42 días de tratamiento. A) Testigo, B) NPs ZnO (1 mg L⁻¹), C): NPs ZnO (10 mg L⁻¹), D) NPs ZnO (100 mg L⁻¹), E) SMPs ZnO (1 mg L⁻¹), F) SMPs ZnO (10 mg L⁻¹), G) SMPs ZnO (100 mg L⁻¹).

eficiencia del PSII. Se ha sugerido que concentraciones elevadas de Zn^{2+} pueden alterar la estructura de los cloroplastos, inhibir la biosíntesis de clorofila y modificar los componentes del PSII (Xiong *et al.*, 2021). En *Nicotiana tabacum*, 100 mg L⁻¹ de NPs ZnO redujo el contenido de la protoclorofilidina oxidoreductasa (POR) y la Mg-protoporfirina, precursores de clorofila, mientras que a 25 mg L⁻¹ aumentaron estas proteínas y la clorofila total, favoreciendo la fotosíntesis (Mardi *et al.*, 2022).

Conocer la concentración de proteínas solubles, que es la fracción activa funcional, es crucial para entender cómo responden las plantas al estrés abiótico. Estas moléculas son muy importantes porque actúan como enzimas catalíticas que soportan el crecimiento y la fotosíntesis, tales como la enzima Rubisco. En el presente estudio las NPs ZnO, a baja concentración (1 mg L⁻¹), promovieron un aumento (32 %) en las proteínas solubles. Se han propuesto a las NPs ZnO como potenciales fertilizantes y bioestimulantes en lechuga (Garza-Alonso *et al.*, 2023), aunque en este último estudio el modelo de aplicación fue foliar.

En el presente estudio, con la aplicación hidropónica de 1 mg NPs ZnO L⁻¹ se obtuvieron respuestas estimulantes de proteínas, Chl total y crecimiento, pero al aumentar la concentración a 100 mg L⁻¹ de NPs y SMPs de ZnO, estas causaron daños importantes, independientemente del tamaño (Figura 3). La actividad de SOD se redujo con 1 y 10 mg ZnO L⁻¹ de NPs y SMPs, mientras que con 100 mg NPs ZnO L⁻¹ la actividad de SOD se incrementó en 43 % respecto al testigo (Figura 3B). La actividad de CAT incrementó 49 % con 100 mg NPs ZnO L⁻¹ y 63 % con 100

mg SMPs ZnO L⁻¹ (Figura 3C). En contraste, la actividad de APX se redujo en presencia de las NPs y SMPs en todas las concentraciones, con excepción de las NPs a 1 mg L⁻¹, la cual aumentó su actividad en 59 % (Figura 3D).

Los estudios de Garza-Alonso *et al.* (2023) reportaron aumentos de la actividad de CAT, APX y GPOX en aplicaciones foliares de NPs ZnO, equivalentes al 50-70 % del total de Zn^{2+} , aplicado convencionalmente a lechuga. Otros estudios han mostrado respuestas variables según el tipo y concentración del ZnO (Azarin *et al.*, 2022). Las NPs más pequeñas y con mayor área superficial, como nanoflores o nanobastones, presentan mayor capacidad antioxidante (Abdullah *et al.*, 2024), pero también mayor generación de EROs, lo que representa un riesgo para los sistemas biológicos debido al daño del ADN y a la peroxidación lipídica (Arbona *et al.*, 2017; Gatoo *et al.*, 2014).

El desequilibrio redox observado en altas concentraciones, 100 mg L⁻¹ de NPs ZnO, contribuyó a la peroxidación lipídica y daño celular, evidenciado por necrosis radicular y clorosis foliar, signos típicos de muerte tisular localizada (Elstner, 1987). En conjunto, los resultados indican que la toxicidad de las partículas de ZnO en lechuga está determinada por el tamaño y la concentración, siendo más severa con SMPs a altas dosis que bajo condiciones hidropónicas, la mayor disponibilidad iónica agrava estos efectos. Este estudio aporta información nueva y valiosa sobre los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de respuesta vegetal a nanomateriales, destacando la importancia de considerar el tamaño y la forma de las partículas en su uso agrícola.

Cuadro 2. Efecto de las NPs ZnO y SMPs ZnO sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos y máxima eficiencia del fotosistema II (PSII) de lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. Grazion en cultivo hidropónico.

Tratamientos (1, 10, 100 mg L ⁻¹)	Concentración (µg cm ⁻²)				Chl total/x+c	Máxima eficiencia del PSII (Fv/Fm)
	Chl a	Chl b	Chl a + b	x+c		
0	11.99 ± 0.35ab	5.25 ± 0.12ab	17.24 ± 0.47ab	3.55 ± 0.12ab	4.86 ± 0.08a	0.81 ± 0.01ab
NPs1	11.44 ± 0.85ab	5.03 ± 0.39ab	16.47 ± 1.24ab	3.45 ± 0.30ab	4.80 ± 0.09a	0.83 ± 0.01a
NPs10	10.60 ± 0.71ab	4.32 ± 0.50ab	14.92 ± 1.17ab	2.94 ± 0.20ab	5.06 ± 0.12a	0.80 ± 0.01ab
NPs100	3.40 ± 0.44cd	1.70 ± 0.22cd	5.11 ± 0.66cd	1.47 ± 0.16cd	3.41 ± 0.10b	0.77 ± 0.01bc
SMPs1	13.06 ± 0.52a	5.75 ± 0.17a	18.81 ± 0.67a	3.84 ± 0.13a	4.90 ± 0.07a	0.78 ± 0.01bc
SMPs10	8.99 ± 1bc	3.93 ± 0.49bc	12.93 ± 1.49bc	2.69 ± 0.29bc	4.79 ± 0.06a	0.78 ± 0.00bc
SMPs100	2.96 ± 0.2d	1.47 ± 0.07d	4.43 ± 0.27d	1.30 ± 0.10d	3.45 ± 0.10b	0.68 ± 0.02c

Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos. En Chl a, Chl b, Chl total (a+b), x+c, Chl total/x+c (n = 6). En la máxima eficiencia de PS II (n = 5), los datos se presentan como media ± EE; (Tukey, P ≤ 0.05).

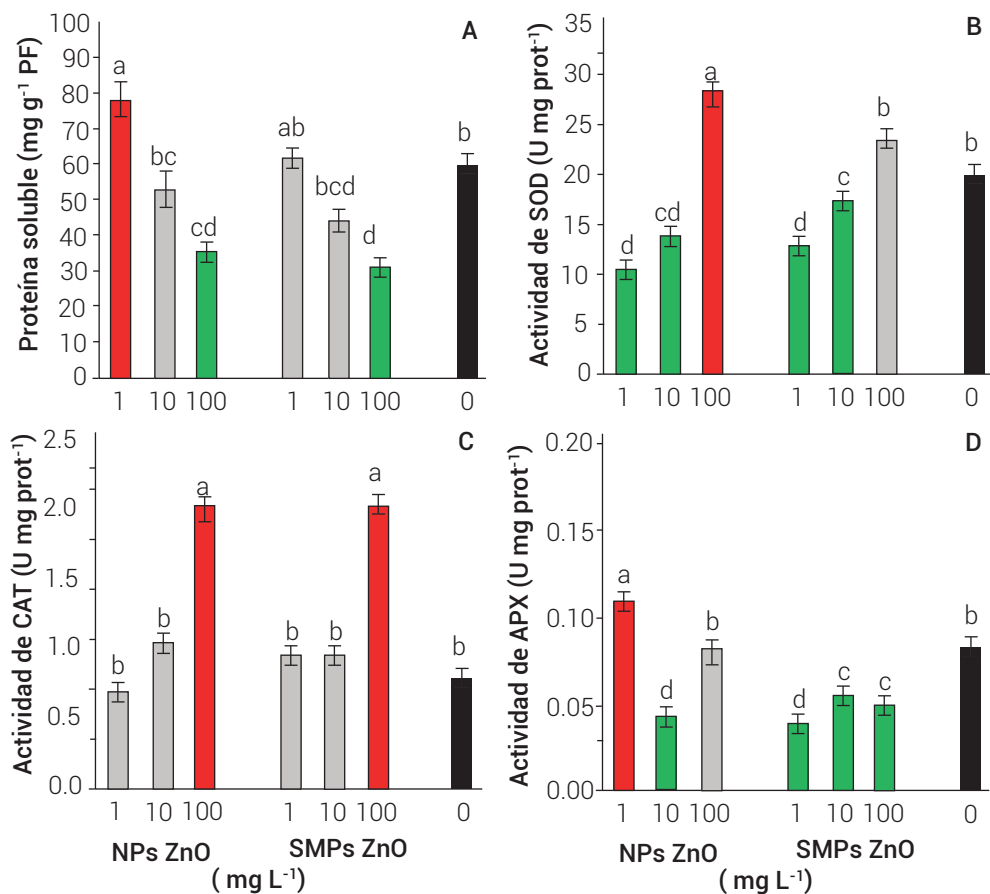


Figura 3. Efecto de las nanopartículas (NPs) y submicropartículas (SMPs) de ZnO en A) la concentración de proteínas solubles, B) la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), C) en la actividad de la enzima catalasa (CAT) y D) en la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX) de hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. Grazion en cultivo hidropónico. Los datos son medias $\pm$ EE (n = 4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). U: μ moles mL⁻¹. Barras en rojo indican superioridad significativa con respecto al testigo, barras en verde indican inferioridad significativa con respecto al testigo.

CONCLUSIONES

El presente estudio aporta evidencia de la importancia del tamaño de partícula del ZnO, como una variable con impacto fisiológico diferencial en lechuga. Respecto a la concentración, a 1 mg L⁻¹ las SMPs promovieron el crecimiento radical con una respuesta hormética, mientras que las NPs incrementaron las proteínas solubles sin estimular el crecimiento. Dosis de 10 y 100 mg L⁻¹ de SMPs redujeron biomasa, pigmentos fotosintéticos, eficiencia del PSII. Altas dosis (100 mg L⁻¹) de ambos tamaños de partícula (NPs y SMPs) incrementaron la actividad de SOD y CAT, pero redujeron proteínas solubles. Las SMPs resultaron más tóxicas que las NPs. Se propone la hipótesis de que las SMPs quedaron adheridas en las raíces de donde liberaron una gran cantidad de iones Zn²⁺,

ocasionando estrés oxidativo, afectando el crecimiento, los pigmentos fotosintéticos y la eficiencia del PSII.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca de doctorado a la primera autora, a la Unidad de Microscopía Electrónica del COLPOS y al Biól. Simón Morales Rodríguez por el apoyo técnico.

BIBLIOGRAFÍA

Abdullah J. A. A., A. Guerrero and A. Romero (2024) Efficient and sustainable synthesis of zinc salt-dependent polycrystal zinc oxide nanoparticles: comprehensive assessment of physicochemical and functional properties. *Applied Sciences* 14:1815, <https://doi.org/10.3390/app14051815>

- Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. In: Methods in Enzymology. Vol. 105. L. Packer (ed.). Academic Press. San Diego, California, USA. pp:121-126, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Afzal S., T. Aftab and N. K. Singh (2022) Impact of zinc oxide and iron oxide nanoparticles on uptake, translocation, and physiological effects in *Oryza sativa* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 41:1445-1461, <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10388-1>
- Arbona V., M. Manzi, S. I. Zandalinas, V. Vives-Peris, R. M. Pérez-Clemente and A. Gómez-Cadenas (2017) Physiological, metabolic, and molecular responses of plants to abiotic stress. In: Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective. Vol. 2. M. Sarwat, A. Ahmad, M. Z. Abidin and M. M. Ibrahim (eds.), Springer International Publishing. Cham, Switzerland. pp:1-35, https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4_1
- Awan S., K. Shahzadi, S. Javad, A. Tariq, A. Ahmad and S. Ilyas (2021) A preliminary study of influence of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of *Brassica oleracea* var. *italica*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 20:18-24, <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.10.003>
- Azarin K., A. Usatov, T. Minkina, A. Plotnikov, A. Kasyanova, A. Fedorenko, ... and S. Alamri (2022) Effects of ZnO nanoparticles and its bulk form on growth, antioxidant defense system and expression of oxidative stress related genes in *Hordeum vulgare* L. *Chemosphere* 287:132167, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132167>
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Dhindsa R. S., P. Plumb-Dhindsa and T. A. Thorpe (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32:93-101, <https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93>
- Elstner E. F. (1987) Metabolism of activated oxygen species. In: Biochemistry of Metabolism. A Comprehensive Treatise. Volume 11, Biochemistry of Metabolism. D. D. Davies (ed.). Academic Press. San Diego, California, USA. pp:253-315, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-675411-7.50014-8>
- Faizan M., A. Faraz, A. R. Mir and S. Hayat (2021) Role of zinc oxide nanoparticles in countering negative effects generated by cadmium in *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Plant Growth Regulation* 40:101-115, <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10059-2>
- Gao F., X. Zhang, J. Zhang, J. Li, T. Niu, C. Tang, ... and J. Xie (2022) Zinc oxide nanoparticles improve lettuce (*Lactuca sativa* L.) plant tolerance to cadmium by stimulating antioxidant defense, enhancing lignin content and reducing the metal accumulation and translocation. *Frontiers in Plant Science* 13:1015745, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1015745>
- Garza-Alonso C. A., A. Juárez-Maldonado, S. González-Morales, M. Cabrera-De la Fuente, G. Cadenas-Pliego, A. B. Morales-Díaz and A. Benavides-Mendoza (2023) ZnO nanoparticles as potential fertilizer and biostimulant for lettuce. *Heliyon* 9:e12787, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12787>
- Gatoo M. A., S. Naseem, M. Y. Arfat, A. M. Dar, K. Qasim and S. Zubair (2014) Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed Research International* 2014:498420, <https://doi.org/10.1155/2014/498420>
- Gupta N., H. Ram and B. Kumar (2016) Mechanism of zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 15:89-109, <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9390-1>
- Hoagland D. R. and D. I. Arnon (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular No. 347. University of California-Berkeley. Berkeley, California, USA. 32 p.
- Hoffmann G. R. (2009) A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose-Response* 7:1-51, <https://doi.org/10.2203/dose-response.08-023.Hoffmann>
- ISO, International Organization for Standardization (2015) Nanotechnologies—Vocabulary—Part 2: Nano-objects. ISO/TS 80004-2:2015(en). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:en> (March 2025).
- Khan S. T., A. Malik, A. Alwarthan and M. R. Shaik (2022) The enormity of the zinc deficiency problem and available solutions; an overview. *Arabian Journal of Chemistry* 15:103668, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103668>
- Kim S. H., S. Bae, Y. W. Sung and Y. S. Hwang (2024) Effects of particle size on toxicity, bioaccumulation, and translocation of zinc oxide nanoparticles to bok choy (*Brassica chinensis* L.) in garden soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 280:116519, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116519>
- Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in Enzymology, Vol. 148. L. Packer and R. Douce (eds.). Academic Press. San Diego, California, USA. pp:350-382, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Mardi A., H. M. Shoja and E. M. Kazemi (2022) Comparative study of growth responses, photosynthetic pigment content, and gene expression pattern in tobacco plants treated with ZnO nano and ZnO bulk particles. *Journal of Nanoparticle Research* 24:208, <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05583-4>
- McCully M., M. Sanchez-Navarro, M. Teixido and E. Giralte (2018) Peptide mediated brain delivery of nano- and submicroparticles: a synergistic approach. *Current Pharmaceutical Design* 24:1366-1376, <https://doi.org/10.2174/1381612824666171201115126>
- Mendes A. R., C. M. Granadeiro, A. Leite, E. Pereira, P. Teixeira and F. Poças (2024) Optimizing antimicrobial efficacy: investigating the impact of zinc oxide nanoparticle shape and size. *Nanomaterials* 14:638, <https://doi.org/10.3390/nano14070638>
- Nair P. M. G. and I. M. Chung (2017) Regulation of morphological, molecular and nutrient status in *Arabidopsis thaliana* seedlings in response to ZnO nanoparticles and Zn ion exposure. *Science of the Total Environment* 575:187-198, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.017>
- Nakano Y. and K. Asada (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* 28:131-140, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268>
- Parihar V., M. Raja and R. Paulose (2018) A brief review of structural, electrical and electrochemical properties of zinc oxide nanoparticles. *Reviews on Advanced Materials Science* 53:119-130, <https://doi.org/10.1515/rams-2018-0009>
- Rai P. K., H. Song and K. H. Kim (2023) Nanoparticles modulate heavy-metal and arsenic stress in food crops: hormesis for food security/safety and public health. *Science of the Total Environment* 902:166064, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166064>
- Sirelkhatim A., S. Mahmud, A. Seeni, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, ... and D. Mohamad (2015) Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters* 7:219-242, <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Wang X., X. Yang, S. Chen, Q. Li, W. Wang, C. Hou, ... and S. Wang (2016) Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 6:1243, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>
- Xiong T., S. Zhang, Z. Kang, T. Zhang and S. Li (2021) Dose-dependent physiological and transcriptomic responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to copper oxide nanoparticles—insights into the phytotoxicity mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 22:3688, <https://doi.org/10.3390/ijms22073688>
- Xu J., X. Luo, Y. Wang and Y. Feng (2018) Evaluation of zinc oxide nanoparticles on lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and soil bacterial community. *Environmental Science and Pollution Research* 25:6026-6035, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0953-7>
- Zhao L., Y. Sun, J. A. Hernandez-Viezcas, J. Hong, S. Majumdar, G. Niu, ... and J. L. Gardea-Torresdey (2015) Monitoring the environmental effects of CeO₂ and ZnO nanoparticles through the life cycle of corn (*Zea mays*) plants and *in situ* μ -XRF mapping of nutrients in kernels. *Environmental Science & Technology* 49:2921-2928, <https://doi.org/10.1021/es5060226>

