



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico-
Biológicas
Facultad de Químico Farmacobiología



**Translocación de nanotubos de carbono durante el
desarrollo de *Avena sativa* y desempeño fotosintético.**

Tesis

**Que para obtener el grado de:
Químico Farmacobiólogo**

Presenta

Marco Antonio Alemán Méndez

Director:

Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno.

Co-director:

Dra. Gladys Juárez Cisneros.

Morelia, Michoacán. Octubre de 2022.

El presente trabajo de investigación plasmado en esta tesis se llevó a cabo durante el periodo septiembre 2021- septiembre 2022 en el laboratorio de Interacción Suelo Planta Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica (CIC) y el apoyo de El Colegio de Michoacán (COLMICH), LADIPA.



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Agradecimientos

Eres el conjunto de las personas que están a tu alrededor.

A mis padres, sin ustedes esto sería imposible muchas gracias por todo el esfuerzo que supuso llegar hasta este momento, se los tendré agradecido de por vida, espero algún día regresarles una ínfima parte de todo lo que me dieron, lo logramos.

Doctora Gladys y Doctor Javier yo no creo en la suerte, pero estoy seguro de que algo tuvo que ver llegar al laboratorio con ustedes, si me convertí en una pequeña parte del investigador que quiero llegar ser se los debo todo a ustedes, gracias por todo el apoyo, paciencia y sobre todo por siempre creer en mí.

Mi pareja, describir lo agradecido que estoy por tenerte en mi vida es imposible, estuviste en los momentos más difíciles de este proceso jamás poder pagar eso, espero que algún día todo esto valga la pena y puedas recoger los frutos de esto conmigo, mi futuro pinta bien siempre que estes a mi lado.

A mis amigos, la vida no sería lo mismo sin ustedes, los malos y buenos momentos siempre son mejores sabiendo que los tengo a mi lado, gracias por esas noches de juego o de ver series juntos, que me ayudaron a llevar los malos ratos, me hace muy feliz la familia que ustedes sean la familia que escogí.

Gracias a mis abuelos porque gran parte de lo que soy es por ustedes, todos sus buenos consejos los tengo grabados en piedra conmigo, donde quiera que estén espero que estén orgullosos de mí.

A mis compañeros de laboratorio, no puedo creer aun que viniendo todos de diferentes lados, tuviéramos tanta química desde un principio, siempre estaré agradecido a la vida por conocerlos.

Gracias a mis sinodales nombres Alvaro Rodríguez Barrón, José Jesús Villagómez Rangel. Flora María Cabrera Matías, Salomón Eduardo Borjas García, Mariela Gómez Romero, por tomarse el tiempo de apoyarme con la revisión, disculpen tanta molestia a las tantas horas de la noche, estoy en deuda con ustedes.

Dedicatoria

“Viaje antes que destino”

Dedico este trabajo a mis padres, que me acompañaron en cada paso que di, que sin importar si era en la dirección correcta o errónea nunca dejaron que lo diera solo.

A mis dos abuelos que se quedaron en el camino, me hubiera encantado que estuvieran conmigo, pero se que me están viendo donde quiera que estén, esto es por ustedes.

Índice

Resumen:	1
Abstract:	2
1. Introducción y antecedentes	3
1.1. La nanotecnología en sistemas biológicos	3
1.2. Las nanopartículas y los sistemas vegetales.....	3
1.3. Nanopartículas.....	4
1.4. Síntesis de NTC	4
1.5. Principales métodos de síntesis de NTC.....	5
1.6. Interacción de nanotubos de carbono en plantas.....	6
1.7. Toxicidad de las nanopartículas.....	8
1.8. Absorción y translocación de NTC en la planta	8
1.9. Absorción y traslocación de nanomateriales en las células vegetales	9
1.10. Fotosíntesis	10
1.11. Importancia de los NTC en la fotosíntesis	12
1.12. Avena sativa	13
2. Justificación.....	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivos:.....	16
4.1 General:.....	16
4.2. Específicos:	16
5. Materiales y métodos En el siguiente esquema, se muestra el procedimiento general de la funcionalización de NTC con FITC y su posterior caracterización.	17
5.1. Diagrama general: funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono sintéticos y naturales.....	17
5.2. Funcionalización covalente de NTC naturales y sintéticos con FITC.....	18
5.3. Caracterización de NTC naturales y sintéticos	18
5.5. Bioensayos de Avena sativa cultivada con NTC naturales y sintéticos	19
5.5.2. Desinfección de la semilla	19
5.5.3. Cebado de semillas.....	19
5.5.4. Siembra de semillas.....	19
5.5.1. Diagrama general: Bioensayo de Avena sativa con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalización con FITC.....	20
5.6.2. Translocación de NTC en tejidos vegetales	20
5.6.1. Diagrama general: análisis anatómico de Avena sativa y translocación de NTC en raíz. ...	21
5.6. Diseño experimental	21

5.7. Variables respuesta.....	22
5.8 Análisis estadístico	23
6. Resultados.....	24
6.1. Caracterización de nanopartículas.....	25
6.1.1. Análisis de nanopartículas por Espectroscopía Raman.....	25
6.1.2. Análisis de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	26
6.1.3. Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	27
6.1.4. Efecto de los NTC naturales y sintéticos en la germinación de <i>Avena sativa</i> ..	31
6.1.5 Efecto de los nanotubos de carbono naturales y sintéticos en el crecimiento de <i>Avena sativa</i>	34
6.1.6 Efecto de los NTC en la estructura foliar de <i>Avena sativa</i>	37
6.1.7 Efecto de los NTC en la arquitectura radical	39
6.1.8 Efecto de los NTC en peso fresco y seco	44
6.1.9 Efecto de los NTC en la tasa fotosintética	46
6.1.10 Traslocación de NTC en tejidos vegetales.....	49
6.1.11 Translocación de NTC funcionalizados con FITC en la raíz de <i>Avena sativa</i>	59
7. Discusión de resultados	60
8. Conclusiones	64
9. Referencias.....	65

Índice de figuras

Figura 1.- Estructura típica de un nanotubo de carbono de pared simple (SWCNT) y nanotubo de carbono de pared múltiple (MWCNT).	4
Figura 2.- Estructura de nanotubo de carbono funcionalizado con O=C-Cl mediante enlace covalente.	6
Figura 3.- Esquema general sobre la absorción y transporte de NTC a través de los tejidos y célula vegetal	10
Figura 4.- Esquema representativo del proceso de la fotosíntesis.	11
Figura 5.- Espectros Raman de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con FITC.	26
Figura 6.- FTIR de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC).	27
Figura 7.- Micrografía SEM de nanotubos de carbono A sintéticos y naturales con y sin funcionalizar con FITC, obtenidas a 10Kv X1000,10,000,20,000 y 40,000 07 30 y 10 30 SEI, la línea representa la escala 10,1 y 0.5 µm.	28
Figura 8.- Micrografía SEM de nanotubos de carbono B sintéticos y naturales con y sin funcionalizar con FITC, obtenidas a 20 y 10Kv X1000,10,000 y 20,000 10 50 y 10 30 SEI, la línea representa la escala 10 y 1 µm.	29
Figura 9.- Micrografía SEM de nanotubos de carbono C sintéticos y naturales con y sin funcionalizar con FITC, obtenidas a 20Kv X2000,5000 y 10,000 11 50, 10 50 y 10 30 SEI, la línea representa la escala 10,5 y 1 µm.	30
Figura 10.- Imágenes que muestran el efecto de NTC A (prístina, oxidados y funcionalizados) en el crecimiento de <i>Avena sativa</i> a los 40 días después de la siembra.	35
Figura 11.- Imágenes que muestran el efecto de NTC B (prístina, oxidados y funcionalizados) en el crecimiento de <i>Avena sativa</i> a los 40 días después de la siembra.	36
Figura 12.- Imágenes que muestran el efecto de NTC C (prístina, oxidados y funcionalizados) en el crecimiento de <i>Avena sativa</i> a los 40 días después de la siembra.	37
Figura 13.- Longitud de plántulas de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	38
Figura 14.- Longitud radical de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	39
Figura 15.- Área radical de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	40

Figura 16.- Volumen radical de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	41
Figura 17.- Longitud de la raíz principal de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	42
Figura 18.- Número de raíces laterales de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	43
Figura 19.- Peso fresco de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	44
Figura 20.- Peso seco de <i>Avena sativa</i> cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.	45
Figura 21.- Efecto de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína sobre Phi2 en <i>Avena sativa</i> después de 40 días de crecimiento.	46
Figura 22.- Efecto de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína sobre phiNO en <i>Avena sativa</i> después de 40 días de crecimiento.	47
Figura 23.- Efecto de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína sobre phiPQ en <i>Avena sativa</i> después de 40 días de crecimiento.	48
Figura 24.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 2.5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia a 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.	49
.....	49
Figura 25.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	50
Figura 26.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 10 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	51
Figura 27.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 20 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	52

Figura 28.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 2.5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	53
Figura 29.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	53
Figura 30.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 10 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	54
Figura 31.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 20 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	55
Figura 32.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 2.5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	56
Figura 33.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	57
Figura 34.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 10 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	58
Figura 35.- Cortes histológicos de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 20 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.....	58
Figura 36.- Fluorescencia en la raíz de <i>Avena sativa</i> tratados con NTC Pristina, oxidados y funcionalizados con FITC en concentraciones de 2.5,5,10,20 µg/mL obtenidos por microscopía de fluorescencia a 4x, y cuantificados en software ImageJ.	59

Tabla 1 Tratamientos para bioensayos con Avena sativa expuesta a los NTC naturales y sintéticos con y sin funcionalización.	21
Figura 6 Espectros Raman de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con FITC.	26
Tabla 2 germinación de Avena sativa cultivada con 0,2.5,5,10,20 µg/mL de NTC-A sin tratamiento (pristina), oxidados y funcionalizados con FITC, 28 días después de la siembra.	31
Tabla 3 germinación de Avena sativa cultivada con 0,2.5,5,10,20 µg/mL de NTC-B sin tratamiento (pristina), oxidados y funcionalizados con FITC, 28 días después de la siembra.	32
Tabla 4 germinación de Avena sativa cultivada con 0,2.5,5,10,20 µg/mL de NTC-C sin tratamiento (pristina), oxidados y funcionalizados con FITC 28 días después de la siembra.	33

ACRÓNIMOS

ATP	Adenosín trifosfato
DMF	N,N-dimetilformamida
DQV	Deposición química de vapor
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
IR	Espectroscopía infrarroja
MWCNT	Multi-Walled Carbon Nanotube
NADPH+ oxidado	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH reducido	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido
NPs	Nanopartículas
NTC	Nanotubos de carbono
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SWCNT	Single-walled carbon nanotubes

Resumen:

La *Avena sativa* es uno de los cultivos más importantes para México, siendo el principal alimento para el ganado, en su cultivo se usan sin pensar en las consecuencias dañando de manera incalculable el medio ambiente, en los últimos años se han buscado nuevas alternativas de eficientizar las producciones agrícolas, debido a esto se han usado NPs tanto como promotoras del crecimiento vegetal como sustitutos de pesticidas, los nanotubos de carbono (NTC) son una de las nanopartículas más utilizadas, si bien se ha demostrado en múltiples ocasiones sus efectos positivos sobre el desarrollo vegetal aún no se logran comprender los mecanismos por lo cual logran estos efectos. Por otro, se ha documentado que, al modificar la estructura de los NTC, funcionalizándolos con isotiocianato de fluoresceína (FITC) esto cambia sus propiedades fisicoquímicas afectando los efectos que tienen sobre *Avena sativa*, se caracterizaron los NTC mediante FTIR, Raman y SEM esto para evaluar los cambios que sufrieron los NTC por la oxidación y funcionalización. Mas adelante se inocularon las semillas de *Avena sativa* con 3 NTC naturales y sintéticos con y sin funcionalizar a concentraciones de 2.5,5,10,20 µg/mL las variables respuesta a evaluar fueron, germinación, biomasa, área foliar, tasa fotosintética y la traslocación de los NTC en la raíz. La oxidación y funcionalización modificó la estructura y características de los NTC. Los NTC promovieron el desarrollo y crecimiento de *Avena sativa*, y mediante microscopia de fluorescencia se demostró la translocación de los nanotubos de carbono en la raíz.

Palabras clave: NTC, funcionalización, promoción del crecimiento vegetal, Nanotecnología y translocación

Abstract:

Avena sativa is one of the most important crops for Mexico, being the main food for livestock, in its cultivation they are used without thinking about the consequences, damaging the environment in an incalculable way, in recent years new efficiency alternatives have been sought agricultural productions are one of the research priorities, due to this NPs have been used both as promoters of plant growth and as substitutes for pesticides, carbon nanotubes (CNT) are one of the most used nanoparticles, although it has been shown On multiple occasions, its positive effects on plant development will not yet be understood, the mechanisms by which these effects will be achieved. On the other hand, it has been documented that, by modifying the structure of CNTs, functionalizing them with fluorescein isothiocyanate (FITC), this changes their physicochemical properties, revealing the effects they have on *Avena sativa*. CNTs were characterized by means of IR Spectroscopy, Raman and electron microscopy. this to evaluate the changes suffered by the NTC due to oxidation and functionalization. Later, the seeds of *Avena sativa* were inoculated with 3 natural and synthetic NTC with and without functionalization at concentrations of 2.5,5,10,20 µg/mL. The variables to be evaluated were germination, biomass response, leaf area, photosynthetic rate and the NTC translocation in the root. Oxidation and functionalization modified the structure and characteristics of the CNTs. The NTC promoted the development and growth of *Avena sativa*, and through fluorescence microscopy, the translocation of carbon nanotubes in the root was developed.

Key words: NTC, functionalization, plant growth promotion, nanotechnology and translocation

1. Introducción y antecedentes

1.1. La nanotecnología en sistemas biológicos

La nanotecnología se ha convertido en una área del conocimiento muy importante en los últimos años, debido a sus aplicaciones en medicina^{1,2}, agricultura³, producción de energía y ayudar con la problemática de las aguas contaminadas entre otras, por lo que realizar más investigación sobre estos campos es una de las prioridades de la ciencia actual. La nanobiología llegó para revolucionar la medicina se ha documentado como nanofármacos ayudan de manera más eficiente y barata al tratamiento de enfermedades², a su vez se usan nanopartículas para la identificación de enfermedades en etapas temprana, y estas son solo algunas de todas las aplicaciones que se están investigando en el campo de la nanomedicina, el área agrícola es vital para la alimentación humana debido al aumento de la población, y la dificultad que se tiene de alimentar de manera correcta a la población del planeta, por lo que encontrar formas más amigables con el medio ambiente y más eficientes es una de las prioridades de la nanotecnología, utilizando nanopartículas para acelerar el crecimiento o tener mejores resultados en germinación⁴ hasta usarlos como un sustituto de los pesticidas³.

1.2. Las nanopartículas y los sistemas vegetales

El mundo de la agricultura tiene constantes retos como el cambio climático, la urbanización, el uso excesivo de los recursos naturales y la acumulación de pesticidas y fertilizantes. Estos problemas se van intensificando al incrementar la población mundial y a su vez la demanda de alimentos, se estima que la población mundial crecerá de 9-10 mil millones para el 2050 (Chen and Yada 2011), por lo que encontrar mejores maneras de producir alimento es una de las prioridades de los centros de investigación actuales³, con esto en mente se han desarrollado muchas tecnologías que mejoran la productividad agrícola. Una de las más usadas es el uso de nanopartículas en los sistemas vegetales, (Suriyaprabha et al. 2012), documentaron que nanopartículas de silicio en *Zea mays* aumentaron la germinación de esta gramínea, a su vez (Shah and Belozeroova 2009) obtuvieron resultados similares en *Lactuca sativa* al agregar nanopartículas de titanio, el uso de nanopartículas también se estudiado como una opción para mejorar la eficiencia de los fertilizantes, estas nanopartículas pueden mejorar la entrega de estos fertilizantes disminuyendo así su

toxicidad y aumentando el tiempo de vida útil (Prasad et al. 2012a), a su vez se han hecho investigaciones sobre la interacción de las nanopartículas y la regulación hormonal ⁵, el uso de esta tecnología es revolucionario y un paso en la dirección correcta para el desarrollo de agricultura sustentable, es decir, más eficiente y con menos efectos negativos sobre el medio ambiente.

1.3. Nanopartículas

Un nanomaterial por definición es una partícula que mide 1~100 nanómetros, pueden ser metálicas u orgánicas. Entre las nanopartículas orgánicas se encuentran los nanotubos de carbono (**NTC**), son alótopos de estructura cristalina del carbono. Existen diferentes tipos de **NTC**, típicamente pueden contener una lámina de grafeno enrollada sobre sí misma haciendo esto un tubo y se denomina single-walled carbon nanotubes (SWCNT). También pueden existir nanotubos de carbono de pared múltiple o multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) que son varias capas de grafeno enrolladas una dentro de la otra unidas por fuerzas de Van der Waals .⁶

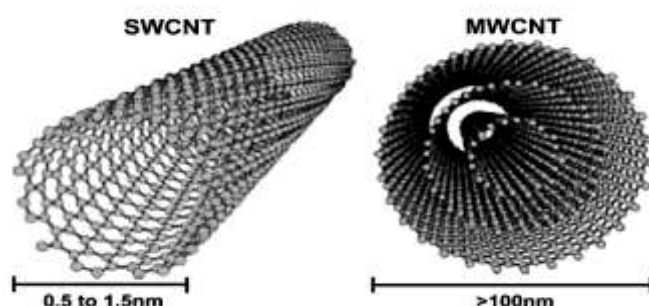


Figura 1.- Estructura típica de un nanotubo de carbono de pared simple (SWCNT) y nanotubo de carbono de pared múltiple (MWCNT).

1.4. Síntesis de NTC

Las propiedades fisicoquímicas de los NTC juegan un papel crucial al momento de interactuar con los sistemas biológicos, por lo que la correcta identificación de su estructura, así como de sus grupos funcionales son piezas clave para entender mejor el papel que pueden llevar a cabo en dichos sistemas, para ello, se han utilizado diferentes métodos cuantitativos y cualitativos que permiten realizar una correcta caracterización. La primera vez que se observaron los NTC de pared múltiple fue en

1991 por Sumio Iijima, y desde entonces se usan herramientas como la espectroscopía de Raman para caracterizar los NTC y así estudiar sus propiedades⁷.

Podemos definir a la espectroscopía Raman como una técnica fotónica que nos proporciona información química y estructural de la mayoría de los materiales ya sea orgánico o inorgánico. Este análisis se basa en la luz dispersada por un material al que se le indujo un haz de luz monocromático⁸. Por su parte el análisis de infrarrojo (IR) mide la intensidad del haz de luz antes y después de que tenga contacto con la muestra, el resultado se expresa con la frecuencia de la luz incidente⁹. Otra de las herramientas para observar la estructura de un nanomaterial es la microscopía electrónica de barrido, esta es técnica clave en la caracterización de nanopartículas para observar y medir su por el tamaño de estas, ya que no podemos verlas en un microscopio tradicional, la microscopía de barrido nos da información muy importante sobre las características de estos materiales.

1.5. Principales métodos de síntesis de NTC

Los NTC se obtienen a gran escala por síntesis química, principalmente por los métodos como ablación por láser, método de descarga de arco y , deposición química de vapor¹⁰ (DQV), la deposición química de vapor es un proceso químico utilizado para producir nanopartículas de alta pureza con un de alto rendimiento de materiales sólidos.

Sin embargo, por mucho tiempo se especuló respecto sobre la posible formación de NTC en ambientes naturales, como en los volcanes esto en base a la información recabada en el monte Etna's de donde se propuso que la lava puede ser capaz de catalizar la síntesis NTC, de cualquier manera, no existía evidencia contundente documentada de la formación de NTC naturalmente ¹¹, sin embargo, en estudios más recientes se ha documentado que en los incendios forestales se alcanzan condiciones parecidas al método DQV, a su vez, se descubrió la presencia de NTC naturales en estos lugares, en muestras de madera de pinos calcinados durante un incendio forestal. Recientemente se estudia su impacto de estos MWCNT naturales en los sistemas biológicos como las plantas y poblaciones microbianas autóctonas y alóctonas¹².

Los **NTC** suelen tener características muy interesantes debido a sus dimensiones en el orden de los nanómetros, y su estructura, presentan estabilidad tanto química como mecánica, sin embargo, uno de los problemas más recurrentes suele ser su baja dispersión y solubilidad, debido a esto, se han tenido ciertos problemas con sus aplicaciones biológicas, por lo que se utilizan procesos físicos o químicos como la funcionalización, para reducir dicha limitante.

Este proceso consiste en modificar la estructura y propiedades de los **NTC**, por lo regular mediante la oxidación química y uniendo moléculas o grupos funcionales en la superficie de estos que, en consecuencia, puede mejorar la solubilidad y dispersión de los **NTC**.

Mediante los diferentes tipos de funcionalización se logran adicionar varios grupos funcionales que le pueden dotar a la nanopartícula diferentes características siendo lo más comunes los ácidos carboxílicos, aminas y amidas.⁶

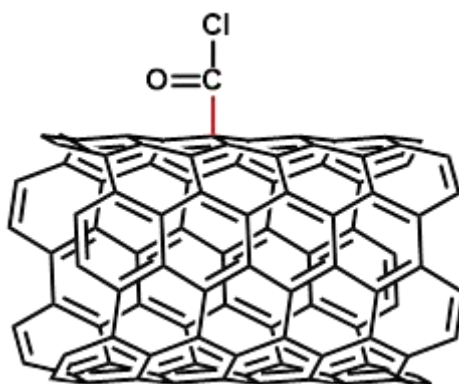


Figura 2.- Estructura de nanotubo de carbono funcionalizado con O=C-Cl mediante enlace covalente.

1.6. Interacción de nanotubos de carbono en plantas

El estudio de **NTC** en la interacción con sistemas biológicos se ha documentado y se sigue explorado cuáles son los efectos de estos nanomateriales en el desarrollo vegetal. Se han reportado efectos significativos del uso de MWCNT en el crecimiento y germinación de *Capsicum annuum*.¹³ Mientras que en el trabajo realizado por (Joshi et al., 2018) en *Avena sativa* se obtuvieron resultados donde los MWCNT estimularon tanto la germinación de la semilla y facilitaron una mayor absorción de agua, lo que causó un incremento en el número de raíces, también se incrementó significativamente la concentración de clorofila y con esto la eficiencia fotosintética.¹⁴

La investigación realizada por (Xiuping Wang et al.,2012) en *Triticum aestivum* demostró que los MWCNT pueden promover la elongación del sistema radical e incrementar la actividad deshidrogenasa, resultando en un crecimiento de raíz más rápido y una producción de biomasa mayor, se pudo observar, a su vez, por medio de microscopía electrónica de transmisión que los MWCNT pueden penetrar la célula vegetal y entrar al citoplasma después de ser absorbidos por las raíces.¹⁵ Por otro lado en su investigación (Zapata et al., 2016) encontraron que en *Brassica oleracea* var. *Italica* expuestas a salinidad, los MWCNT se translocaron en las células incrementando la absorción de agua y asimilación de CO₂, además causaron una mayor transducción de acuaporinas contrarrestando los efectos negativos del estrés salino.¹⁶ Mientras que (Khodokavskaya et al 2014) reportaron que usando concentraciones de 10 a 40 µg/ml los NTC pudieron penetrar las semillas de tomate incrementando la germinación y aumentaron el crecimiento de las plántulas¹⁷. También en *Brassica juncea* al agregar NTC se incrementó el peso de las raíces, el porcentaje de germinación y crecimiento¹⁷. Si bien, los efectos de los NTC de origen natural aún son escasos, debido a su reciente descubrimiento, en el trabajo realizado por (Lara Romero et al., 2017) se documentó el primer reporte donde los NTC que se generan durante los incendios forestales, tuvieron un impacto positivo en las plantas de ese ecosistema, estimulado la velocidad y porcentaje de germinación de la semilla y promoviendo el desarrollo vegetal en las plántulas.

Por otro lado, se han realizado estudios para intentar explicar cuál es la relación que existe entre los NTC, el transporte de agua en las plantas, así como el aumento en la traducción de acuaporinas que son cruciales para la germinación, elongación, reproducción y fotosíntesis¹⁶. Al respecto se ha documentado que los NTC tienen la capacidad de crear nuevos poros en la célula vegetal en plantas de tomate y con esto mejoran la absorción de nutrientes y agua¹⁶.

Por otro lado, se ha sugerido que los NTC tienen la capacidad de estimular la producción de lípidos en la membrana y con esto, mantener la integridad celular, lo que colateralmente en plantas sometidas a estrés por salinidad reduce los efectos negativos¹⁶. Por otro lado, se ha documentado que los NTC contribuyen al desarrollo vegetal, actuando en el control de patógenos fúngicos¹⁸, (Zhao et al. 2014) afectando la formación de las hifas y así provocando su muerte.

1.7. Toxicidad de las nanopartículas

Las plantas son uno de los pilares de un sistema ecológico, debido a esto la bioacumulación y próxima distribución es un factor clave en el estudio de la relación con los NTC, de cualquier manera, se ha demostrado que los diferentes efectos que se tienen al exponer una planta a NTC como la germinación de la semilla y otros procesos físicos simultáneamente pueden llegar a aumentar la toxicidad en *Copersicon esculentum*, *Allium cepa* y *Cucumis sativus*¹⁹.

Diversos estudios han demostrado que los NTC pueden penetrar de manera eficaz las células de la planta causando una respuesta de estrés a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en consecuencia pueden llegar a interferir en la regulación de diferentes procesos metabólicos de la planta.²⁰ Shen et al. (2012) realizó una investigación en *Oryza sativa* donde sugirió que la clave de la toxicidad de las NTC está en su tamaño, por otra parte se ha documentado efectos fitotóxicos causados con los NTC, por ejemplo. (Diamond L. McGehee et al., 2017) hicieron un estudio en *Solanum lycopersicum* suplementado con MWCNT, estos incrementaron la producción del fruto del tomate, pero al cuantificar mediante microwave induced heating (MIH) encontraron absorción de MWCNT por los frutos del tomate afectando los metabolitos secundarios de estos, por lo que es importante tener en cuenta el riesgo tóxico que pueden causar estos nanomateriales²¹.

1.8. Absorción y translocación de NTC en la planta

El estudio de los mecanismos y los factores mediante los cuales los NTC se translocan dentro de la planta son un factor importante, para evaluar su posible bioacumulación en tejidos vegetales y sus efectos subyacentes²². Usualmente la absorción y traslocación de NTC se estudia junto a la fitotoxicidad ya que esta juega un rol importante en la seguridad alimentaria⁴.

Se ha documentado que, una vez que las nanopartículas penetran la planta, pueden transportarse en los tejidos vegetales mediante las vías simplástica y apoplástica. A través de la vía apoplástica las nanopartículas se transportan rodeando la célula y sin gasto energético, mientras que por la vía simplástica atraviesan la banda caspary necesitando energía²³, por lo que podemos decir que el proceso de absorción y traslocación es mecanismo de transporte activos y pasivo donde muchos mecanismos celulares están implicados²⁴. Otra vía mediante la cual los NTC pueden entrar a la planta es por endocitosis²⁴ (**figura 3**).

El tamaño de los NTC juega un papel clave para su absorción en las plantas ya que en algunas ocasiones deben atravesar los estomas, el tamaño también influye en su acumulación en los tejidos vegetales, toxicidad y la cinética de transporte en las células de la planta, por otro lado, la forma de los NTC está relacionado con la aglomeración y la reactividad²⁵, al respecto algunos estudios han demostrado que también las características de la especie vegetal juega un papel importante en la translocación de NTC, por ejemplo, investigaciones previas documentaron que los NTC pueden acumularse en la raíz de *Oryza sativa* pero no en *Cucurbita pepo* y *Raphanus raphanistrum*²⁶, adicionalmente se ha visto que NTC pueden internarse y tomar lugar en las raíces como en *Catharanthus roseus*²⁷, por su parte se ha reportado que en células de *Avena sativa* la bioacumulación de nanopartículas a base de Cd y Zn pudieron penetrar a través del espacio intermembranal y llegar al cotiledón²⁸, en otro estudio realizado por Khodakovskaya et al. (2009,2011) encontraron que al administrar NTC en *Lycopersicon esculentum* las nanopartículas podían llegar a las hojas por dos rutas a través de la cutícula y a través de los estomas²⁹.

1.9. Absorción y traslocación de nanomateriales en las células vegetales

Se han propuesto diverso mecanismo mediante los cuales las nanopartículas ingresan a la célula, por ejemplo, mediante a la endocitosis a través de la invaginación de NTC por la membrana plasmática²⁴. Por otra parte, se propone que algunos nanomateriales pueden llegar a formar poros en la membrana plasmática, y con esto entrar a la célula, directamente en el citosol³⁰. Otro mecanismo propuesto, es el ingreso de nanopartículas a través de transportadores de proteínas, las nanopartículas pueden ser rodeadas por proteínas, para entrar por la membrana celular, sirviendo como transportadores que facilitan el proceso de entrada a la célula³¹. Algunos nanomateriales no pueden entrar por los canales de la célula a menos que el poro de estas sea modificado.³²

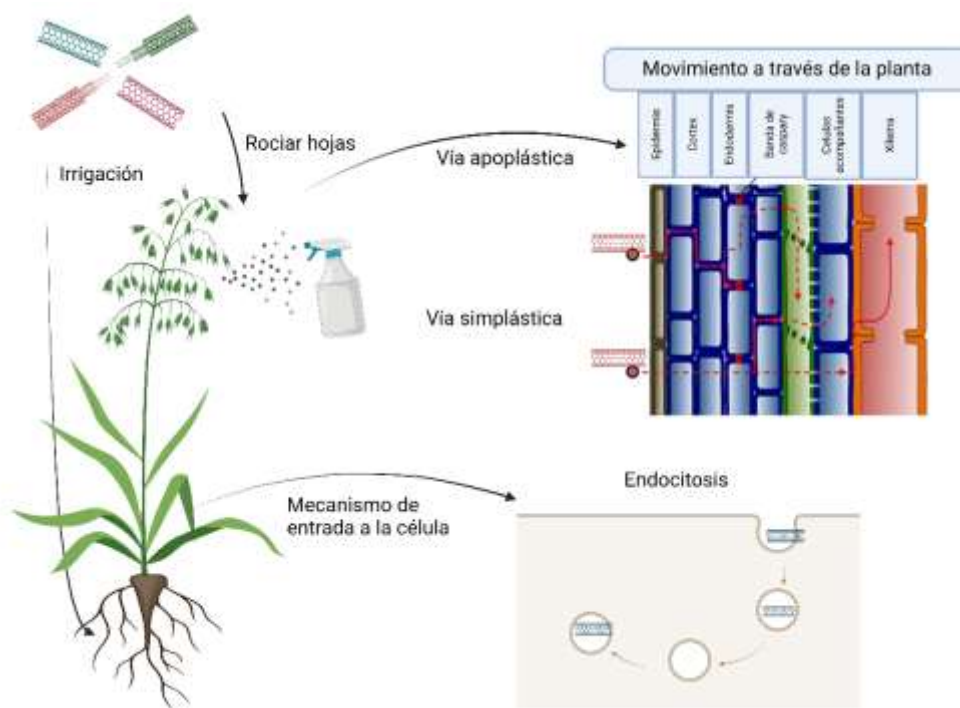


Figura 3.- Esquema general sobre la absorción y transporte de NTC a través de los tejidos y célula vegetal

El desarrollo vegetal depende de diversos factores bióticos y abióticos como la cantidad de agua, calidad del suelo, cantidad de luz recibida, disponibilidad de nutrientes. En conjunto estos factores regulan procesos metabólicos en las plantas, esenciales para su crecimiento y desarrollo, por ejemplo, procesos como la fotosíntesis.³³

1.10. Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso biológico fundamental, presente en las plantas, algas y algunas bacterias, en las plantas este proceso se ha dividido en dos grandes fases: 1) La fase lumínica o fotoquímica, mediante la cual las plantas transforman la energía luminosa en energía química NADPH (nicotín adenín dinucleótido fosfato) y el ATP (adenosín trifosfato)³⁴, y 2) la fase oscura o Ciclo de Calvin, mediante la cual se obtienen hidratos de carbono a través de la fijación del CO₂ atmosférico, usando el NADPH y el potencial energético del grupo fosfato del ATP obtenido de la fase lumínica.³⁵

La fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, estos se encuentran principalmente en hojas y tallos verdes. En los cloroplastos se encuentran los tilacoides, son estructuras en forma de moneda que al apilarse se les conoce como granas.³⁶ La fase lumínica de la fotosíntesis ocurre en la membrana de los tilacoides estos contienen una cadena transportadora de electrones y un sistema fotosintético conformado por pigmentos como la clorofila. La fase lumínica es dependiente de la luz, la clorofila “a” capta 2 fotones y estos a su vez desplazan a los electrones a través de una cadena de óxido-reducción. La clorofila recupera los electrones perdidos mediante la biofotólisis del agua, esto produce una liberación de O_2 . Como resultado del transporte de electrones se bombean protones de la membrana tilacoidal hacia el interior, la fuerza protón-motriz da como resultado el proceso de síntesis de ATP. A su vez, las reacciones de transporte electrónico generan tanto protones como electrones altamente energéticos. En conjunto, estas dos partículas transforman $NADP^+$ en NADPH. Mientras que la fase oscura es independiente de la luz se lleva a cabo en el estroma, y ocurre cuando se utilizan los productos de la fase lumínica para formar carbohidratos a partir de la fijación de CO_2 en un proceso llamado ciclo de Calvin.³⁵

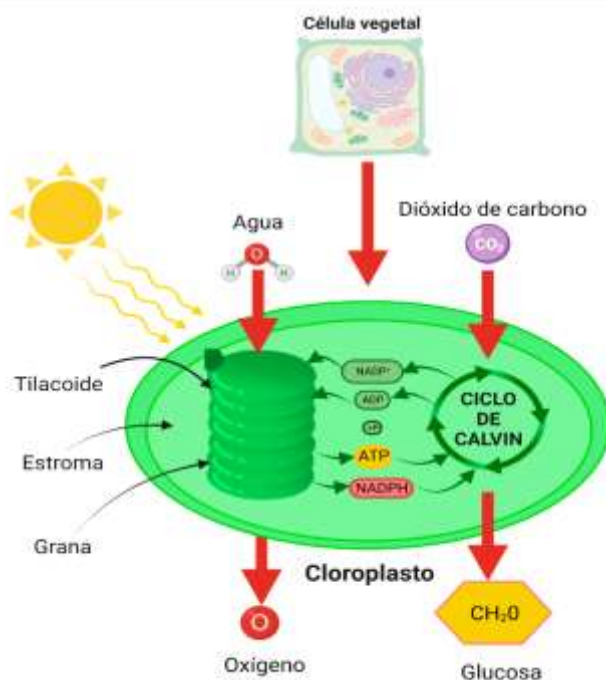


Figura 4.- Esquema representativo del proceso de la fotosíntesis.

1.11. Importancia de los NTC en la fotosíntesis

Si bien, en la última década el estudio de los NTC en los sistemas biológicos es creciente, la literatura actual es insuficiente para comprender el papel que desempeña en procesos como la fotosíntesis. En este contexto, recientes investigaciones pioneras, han propuesto que los NTC llegan a penetrar el tonoplasto mediante difusión pasiva, en consecuencia, estas nanopartículas tienen la capacidad de intervenir en la cadena transportadora de electrones en la fotosíntesis³⁷. Así mismo Giraldo et al (2016) realizaron varias pruebas, infiltrando NTC en cloroplastos y se demostró un incremento en la actividad fotosintética a diferencia de los cloroplastos sin NTC³⁷. Han et al (2016) demostraron la posibilidad de que los NTC optimizaran la conversión de luz solar en energía más eficientemente y así transferirla a los electrones del sistema fotosintético³⁸, por otra parte, se han realizado investigaciones donde se soporta que las NTC ayudan a estabilizar la luz utilizada en la fotosíntesis³⁹, así como Strano et al (2016) evidenciaron un aumento del 300% sobre la eficiencia fotosintética en plantas de *Arabidopsis* tratadas con NTC⁴⁰. Con el conocimiento actual se ha demostrado en múltiples ocasiones una interacción entre NTC y la maquinaria fotosintética, pero hasta ahora esto principalmente es en células aisladas.¹⁷

Todas estas interacciones son esperanzadoras para incrementar la producción de cultivos de interés ,agrícola, por lo que se hace necesario continuar estudiando la correlación NTC-fotosíntesis⁴¹.

Los efectos negativos de la interacción NTC-fotosíntesis también se han documentado, siendo las dosis altas de estos nanomateriales la principal causa asociada a las de alteraciones estructurales en el sistema de membranas de los cloroplastos reduciendo así la actividad fotosintética⁴². En un estudio reportado por Velikova et al (2006), se demostraron que concentraciones de 100 y 300 µg/mL redujo el desempeño fotosintético en la planta siendo la concentración de estos nanomateriales el factor principal asociado al efecto negativo¹⁷.

1.12. *Avena sativa*

La *Avena sativa* pertenece a la familia de las gramíneas, posee raíces abundantes y profundas, tallos más gruesos y rectos de ~1 a 1.5m comparado con otros cereales, sus hojas son alargadas y planas con un borde dentado al final de la hoja y sus flores tienen forma de racimo de espiguillas. En México esta gramínea se utiliza principalmente como cultivo forrajero, pero también tiene usos para consumo humano y biotecnológico. La producción de *Avena sativa* ocupa el quinto lugar a nivel mundial, siendo el cereal que predomina en los climas más fríos dado que suele ser más productiva en estos climas o suelos con un bajo grado de fertilidad, lo que les confiere una ventaja comparada con otros cereales.³³

2. Justificación

En los últimos años la nanotecnología se ha convertido en una de las tecnologías incipientes que ha revolucionado el desarrollo industrial, tecnológico y científico. En áreas como la agricultura, el estudio de nanopartículas como los nanotubos de carbono (NTC) representa un tema de gran relevancia, debido a que se les ha efectos positivos en desarrollo vegetal, asociado al incremento en el porcentaje de germinación y, la mejora en el aprovechamiento de nutrientes. Sin embargo, aun cuando estos resultados se han demostrado en múltiples modelos biológicos, el conocimiento sobre el papel que desempeñan los NTC en las plantas sigue siendo insuficiente. Por otro lado, la traslocación de las NPs en las plantas y su impacto en la tasa fotosintética sigue siendo poco claro, así como los efectos de dicho proceso en el desarrollo vegetal, por su parte la funcionalización es clave para incrementar la relación entre las NPs y los sistemas biológicos.

Por lo que en este proyecto se aportará nuevo conocimiento científico sobre los efectos de los NTC sobre el desarrollo de *Avena sativa*, así como evaluar la translocación de los NTC, su participación en procesos como la fotosíntesis y de esta forma entender mejor cuál es su funcionamiento.

3. Hipótesis

Los nanotubos de carbono funcionalizados mejoran el desarrollo de *Avena sativa* al incrementar su bioacumulación en tejidos vegetales y estimular la actividad fotosintética.

4. Objetivos:

4.1 General:

Determinar el efecto de los nanotubos de carbono funcionalizados en la estimulación del desarrollo de *Avena sativa* mediante el incremento de su bioacumulación en los tejidos vegetales y su eficiencia en la tasa fotosintética.

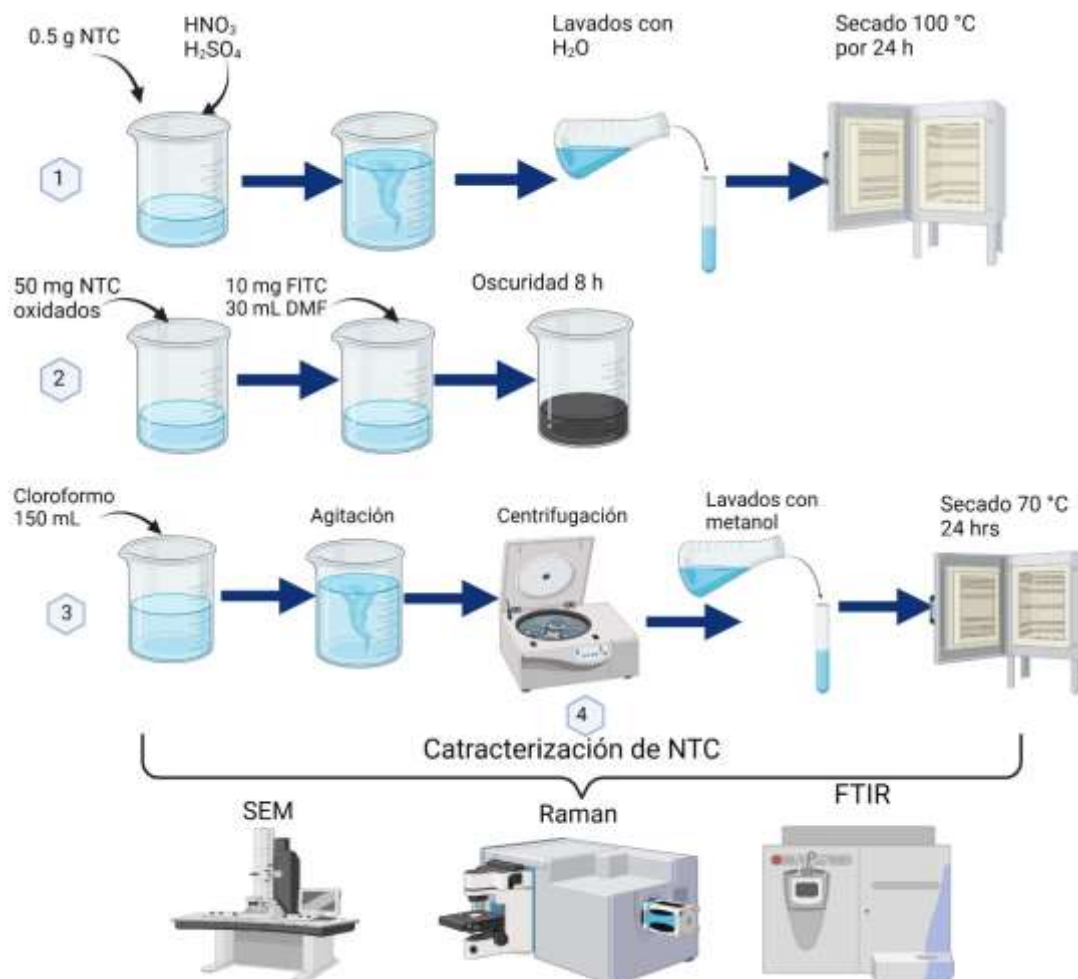
4.2. Específicos:

- 1.-Funcionalizar y caracterizar nanotubos de carbono sintéticos y naturales
- 2.- Evaluar el efecto de nanotubos de carbono sintéticos y naturales funcionalizados en el desarrollo de *Avena sativa*.
- 3.- Determinar el efecto de la funcionalización sobre la traslocación de nanotubos de carbono en la raíz de *Avena sativa*.
- 4.- Evaluar el efecto de los nanotubos de carbono sintéticos y naturales funcionalizados sobre la tasa fotosintética de *Avena sativa*.

5. Materiales y métodos

En el siguiente esquema, se muestra el procedimiento general de la funcionalización de NTC con FITC y su posterior caracterización.

5.1. Diagrama general: funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono sintéticos y naturales



Para llevar a cabo este proyecto de investigación se utilizaron tres diferentes tipos de NTC:

NTC-A= NTC sintéticos: Los MWCNT sintéticos utilizados en este estudio tenían un diámetro exterior de 6 a 13 nm, el diámetro interno de 2,0–4,0 nm, longitud de 2,5–20 μm , un espesor de pared promedio de 7–13 capas de grafeno y pureza $>98\%$.

NTC-B= NTC sintéticos: Se analizaron los MWCNT obtenidos por la técnica de descomposición térmica (Pirólisis). El EDX medido se utilizó para registrar la composición elemental y la pureza de fase del MWCNT. Los resultados mostraron una pureza de $\sim 98\%$ (C-K =70.75% y O-K =27.08%, mientras que otros elementos (K-K, Ca-K) se encontraron en concentraciones de $\sim 1.00\%$; además, el % atómico

medido confirmó la presencia de carbono y el oxígeno como elementos químicos principales presentes en las muestras, correspondientes a la composición de MWCNT, y también, los patrones XRD de MWCNT, donde se exhiben los picos típicos (002) de MWCNT, los espectros mostraron las bandas ID ($\sim 1370\text{ cm}^{-1}$), IG ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$) y 2D ($\sim 2640\text{ cm}^{-1}$), correspondientes a las bandas de MWCNT.

NTC-C= NTC naturales: Se obtuvieron MWCNT naturales de muestras de madera carbonizada de *P. oocarpa* recolectadas seis semanas después de un incendio forestal en Montaña Huashan en Nahuatzen Michoacán, México. Los MWCNT encontrados tenían ~ 10 capas, con un diámetro interior de $\sim 2,52\text{ nm}$ y un diámetro exterior de $\sim 14,59\text{ nm}$.

5.2. Funcionalización covalente de NTC naturales y sintéticos con FITC

De acuerdo con el esquema anterior, para funcionalizar los NTC, el primer paso consistió en oxidar 3 diferentes tipos de NTC mediante con una mezcla de HNO_3 y H_2SO_4 2:3 (v/v) en agitación constante durante 24 h. Posteriormente, para eliminar residuos de ácido se decantó y se realizaron 5 lavados con H_2O destilada. Finalmente, los NTC fueron secados en horno a $100\text{ }^\circ\text{C}/24\text{ h}$.

Posteriormente los NTC oxidados y secados fueron funcionalizados con Isotiocianato de fluoresceína, para ello, se agregó FITC y N,N-dimetilformamida (DMF), y se dejó en oscuridad durante 8 h, pasado ese tiempo se agregaron 150 mL de cloroformo y se dejó en agitación durante 1 h. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 3 minutos, se recuperó el precipitado y se le realizaron varios lavados con metanol, y se dejaron secar los NTC en horno a $70\text{ }^\circ\text{C}/24\text{ h}$.

5.3. Caracterización de NTC naturales y sintéticos

Los NTC naturales y sintéticos con y sin funcionalizar fueron caracterizados por los siguientes métodos analíticos.

- Espectroscopía Raman: Para realizar este análisis se utilizó un Microscopio Raman, Thermo Scientific modelo DXR.
- Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier: Para realizar este análisis se utilizó un espectrómetro de infrarrojo modelo difractómetro Bruker,

D8 advance y empleando una radiación $K\alpha$ de Cu, operando a 35 kV y 35 mA. Las muestras se analizaron en un intervalo 2θ de 10 a 70° y 0.02° por paso, con una velocidad de barrido de 5°/min.

- Microscopía electrónica de barrido: Para realizar este análisis se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB), modelo JEOL-JSM-6390LV/LGS. acoplado con microsonda de energía dispersiva (EDS) modelo LK-IE250 OXFORD INCA ENERGY 250, y fuente de excitación de Fluorescencia de rayos X modelo IXRF-XRF-TUBE-SEM.

5.5. Bioensayos de *Avena sativa* cultivada con NTC naturales y sintéticos

Para el establecimiento de bioensayos dosis respuesta de *Avena sativa*, se utilizaron NTCA, B y C. Se adicionaron los NTC pristina (sin oxidar ni funcionalizar, oxidados o funcionalizados. Para ello se realizó la siguiente metodología:

5.5.2. Desinfección de la semilla

Semillas de *Avena sativa* fueron desinfectadas con etanol al **90%** durante 7 min, posteriormente se realizarán 5 lavados con H₂O destilada estéril, en el último lavado se dejaron 3 veces el volumen que ocupan las semillas con H₂O, se vernalizaron durante 72 h / 4 °C.

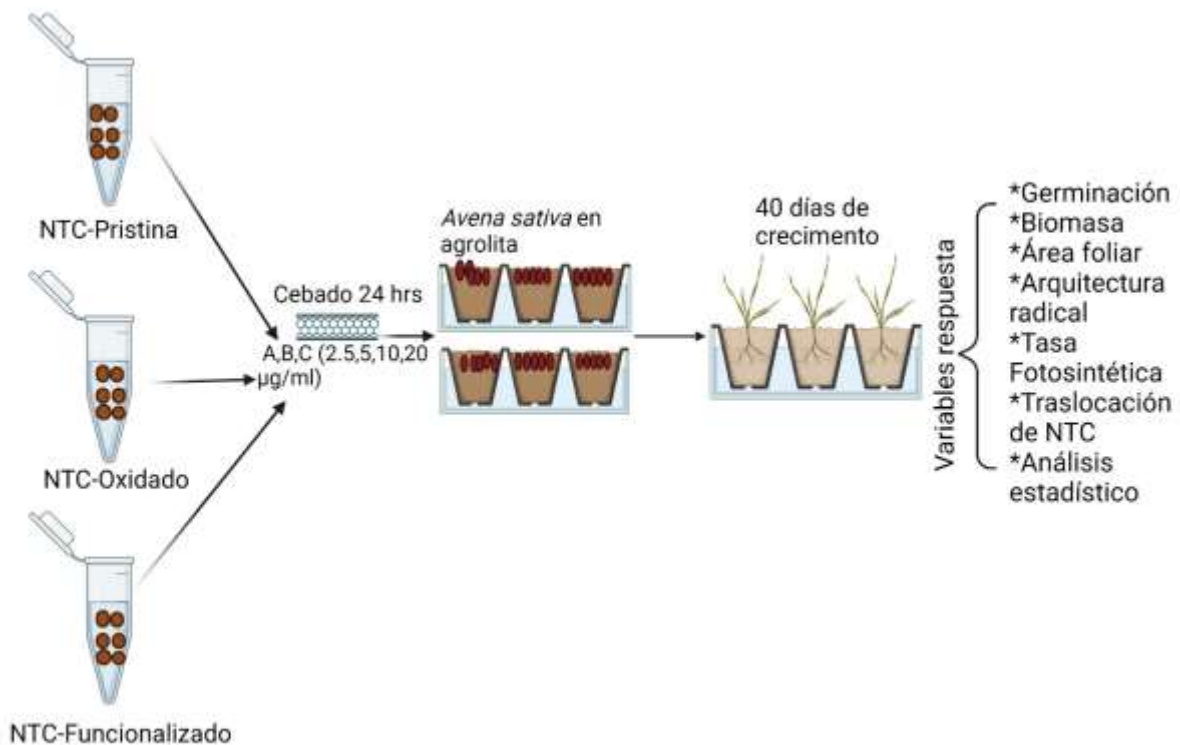
5.5.3. Cebado de semillas

Las semillas previamente desinfectadas se inmergieron en una solución con 2.5, 5,10, y 20 µg/mL de NTC naturales o sintéticos no funcionalizados (pristina), oxidados o funcionalizados durante 24h.

5.5.4. Siembra de semillas

La siembra se realizó en macetas con agrolita estéril, colocando 5 semillas por maceta, 3 réplicas por tratamiento, posteriormente se conservaron en fitotrón durante 30 días a 22° C.

5.5.1. Diagrama general: Bioensayo de *Avena sativa* con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalización con FITC

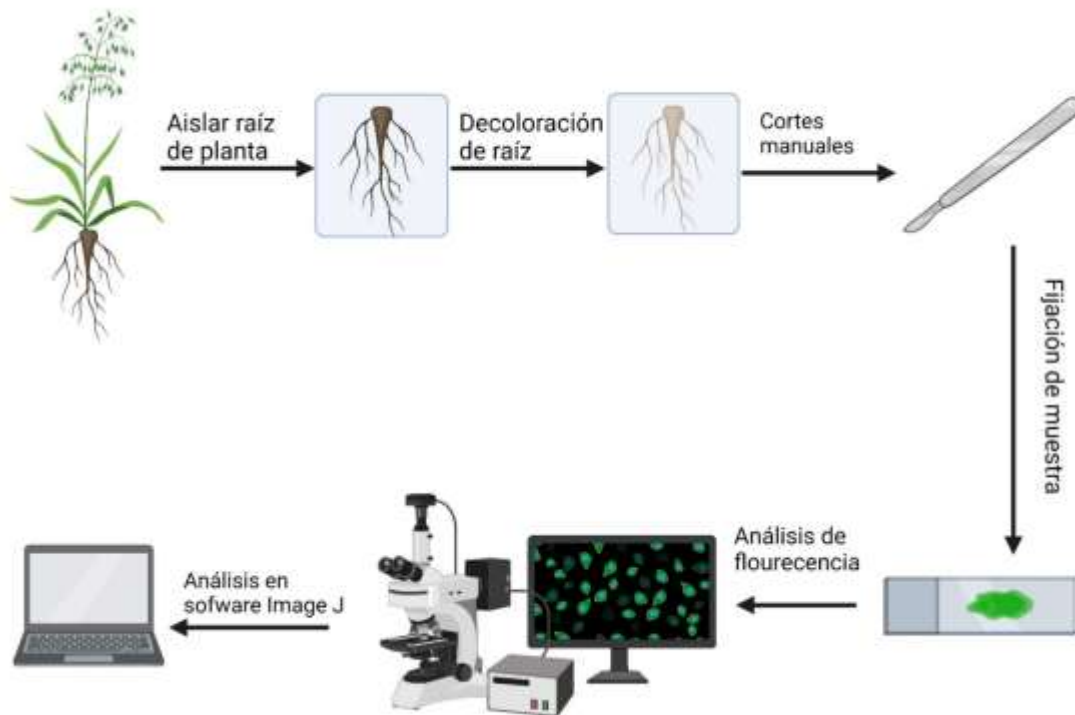


5.6.2. Translocación de NTC en tejidos vegetales

Para evaluar la translocación de NTC en avena, se realizaron cortes histológicos y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia, como se describe a continuación

- **Despigmentación de la planta:** 30 días posteriores a la siembra las plántulas fueron aclareadas con NaOH al 7% (w/v) por 60 min, posteriormente con etanol al 40 % (v/v) por 24 horas, 20% (v/v) y 10% (v/v) por 30 min en secuencia cada uno.
- **Cortes histológicos:** Se hicieron cortes manuales usando un bisturí, cuidado no dañar las estructuras de la planta, se colocaron en un portaobjetos, de manera que los haces vasculares quedaran apuntando hacia arriba.
- **Observación al microscopio de fluorescencia:** Se obtuvieron 4 muestras de cada tratamiento en el microscopio de fluorescencia con las siguientes condiciones; exposición de la muestra a 211, tiempo de exposición a 974.886 ms y ganancia analógica de 3.55. Posteriormente, se realizó la cuantificación de fluorescencia en software Imagen J.

5.6.1. Diagrama general: análisis anatómico de *Avena sativa* y translocación de NTC en raíz.



5.6. Diseño experimental

Para el establecimiento de los experimentos, se realizó un diseño experimental totalmente aleatorio, con un control y 24 tratamientos con diferentes concentraciones de NTC artificiales y naturales organizados de la siguiente manera.

Tabla 1.- Tratamientos para bioensayos con *Avena sativa* expuesta a los NTC naturales y sintéticos pristina, oxidados y funcionalizados

Tratamientos	NTC-Pristina (µg/ml)	NTC-Oxidados (µg/ml)	NTC- Funcionalizados (µg/ml)
CONTROL	-	-	-
	5	-	-
	10	-	-
	20	-	-
NTC SINTÉTICO-A	30	-	-
	-	5	-
	-	10	-
	-	20	-
	-	30	-
	-	-	5
	-	-	10
	-	-	20
NTC SINTÉTICO-B	-	-	30
	5	-	-
	10	-	-
	20	-	-
	30	-	-
	-	5	-
	-	10	-
	-	20	-
NTC NATURAL- C	-	30	-
	-	-	5
	-	-	10
	-	-	20
	-	-	30
	5	-	-
	10	-	-
	20	-	-
	30	-	-
	-	5	-
	-	10	-
	-	20	-
	-	30	-
	-	-	5
	-	-	10
	-	-	20
	-	-	30

5.7. Variables respuesta

Las variables respuesta fueron las siguientes:

- Porcentaje y velocidad de germinación de *Avena sativa*
- Variables de crecimiento: área foliar, biomasa, arquitectura radical
- Determinación de tasa fotosintética de plántulas de *Avena sativa*
- Evaluación de translocación de los NTC funcionalizados con FITC en los tejidos de *Avena sativa*.

5.8 Análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos 60 días después de la siembra, fueron analizados mediante prueba ANOVA-Tukey con $p = \geq 0.05$, con $n=5$ en el software JMP Pro Statistical Discovery.

6. Resultados

La descripción de resultados se realizará en dos etapas:

ETAPA I: Funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono naturales y sintéticos.

ETAPA II: Bioensayos de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalización.

ETAPA I. Caracterización de nanotubos de carbono

6.1. Caracterización de nanopartículas

Para identificar los cambios estructurales generados como consecuencia del proceso de funcionalización de NTC, así como confirmar dicho proceso, los NTC A, B y C sin funcionalizar (PRISTINA) se compararon con los NTC A, B y C oxidados y NTC A, B y C funcionalizados mediante diferentes métodos complementarios entre sí:

6.1.1 Análisis de nanopartículas por Espectroscopía Raman

Los resultados obtenidos por espectroscopia de Raman, de los 3 diferentes NTC (A, B, C) sin tratamiento, oxidados y funcionalizados con **FITC** se muestran en la **figura 5**. En todos los casos, se identificaron dos de los picos característicos de los NTC de pared múltiple correspondiente a la banda ID ($\sim 1,370\text{ cm}^{-1}$), IG y ($\sim 1,600\text{ cm}^{-1}$), mientras que la relación ID/IG, nos indica la cristalinidad y/o pérdida de esta causada por la cantidad de defectos en la estructura del NTC causada por la acción de agentes oxidantes (Wang et al., 2005). El NTC A (**figura 5**) muestra que la relación ID/IG inicialmente era de 0.824, al oxidarlos ID /IG fue de 0.8979 y al funcionalizarlos se obtuvo ID/IG de 0.8073. Por otro lado, los valores ID/IG del NTC B (**figura 5**) fueron de 0.8454 oxidado, 0.8389 en el funcionalizado. Finalmente, la relación ID/IG de los NTC C (**figura 5**) fue de 0.60, 0.8494 y 0.5968 para los NTC pristina, oxidados y funcionalizados respectivamente. Los valores de ID/IG de los NTC nos indican que al momento de realizar la oxidación la cristalinidad de los NTC está disminuyendo esto puede ser debido a la ruptura de los enlaces C=C del grafeno, esto sucedió en los 3 NTC, mientras que en los NTC funcionalizados el valor de ID/IG disminuyó con respecto a los oxidados, esto podría explicarse, porque al funcionalizar con **FITC** estos espacios dejados en la red cristalina causada por la ruptura de los enlaces del carbono fueron ocupados con los nuevos enlaces de la funcionalización con la molécula **FITC**.

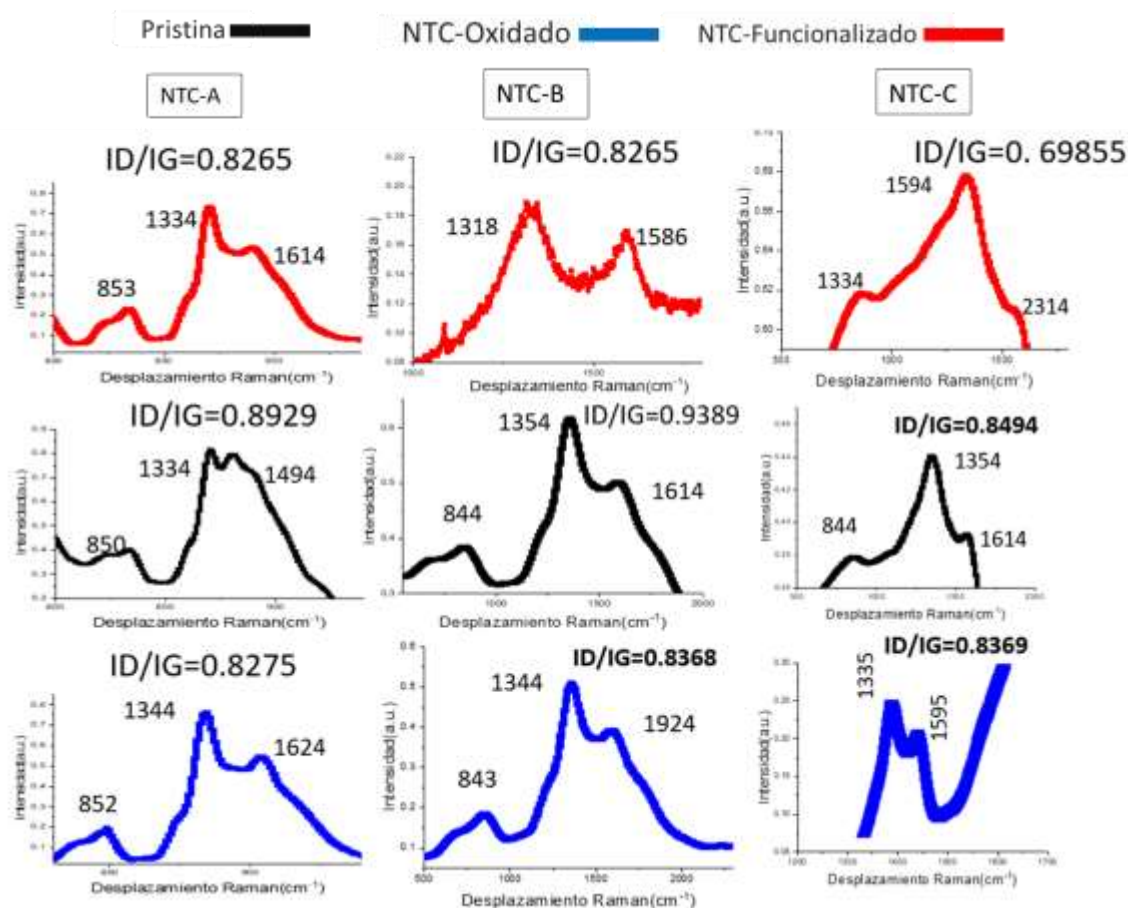


Figura 5.- Espectros Raman de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con FITC.

• 6.1.2 Análisis de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la **figura 5**, se muestran los resultados obtenidos mediante FTIR en los NTC-A (Pristina) mostraron grupos C=C a 1536 cm^{-1} y CH a 993 cm^{-1} , en tanto que los NTC-A-oxidados muestran los mismos grupos funcionales, sin embargo, también se detectaron grupos OH a 1303 cm^{-1} , mientras que con la funcionalización de los NTC-A se identificó también el grupo N=C=O a 2116 cm^{-1} , característico de los isocianatos. Por su parte, en el caso de los NTC-B se sustituyeron los grupos funcionales C=C a 1536 cm^{-1} y C-H a 993 cm^{-1} por otros como C-H a 995 cm^{-1} , C=C a 1537 cm^{-1} y C=O a 1720 cm^{-1} . Y confirmamos la funcionalización del isotiocianato de fluoresceína mediante la detección C=C y CH, además observamos un grupo N=C=S a 2166 cm^{-1} , del isocianato y grupos NH a 3703 cm^{-1} . Con respecto de los NTC-C (Pristina) observamos la sustitución de los grupos funcionales C=C a 1700 cm^{-1} y CH₃ a 1156 cm^{-1} por los grupos OH a 1040 cm^{-1} y C=O a 1773 cm^{-1} esto nos corrobora que la oxidación se llevó a cabo, en el caso de la funcionalización con FITC, esta se confirmó

al observar los grupos NH a 1592 cm^{-1} y N=C=O a 2162 cm^{-1} característico de los isocianatos⁴³.

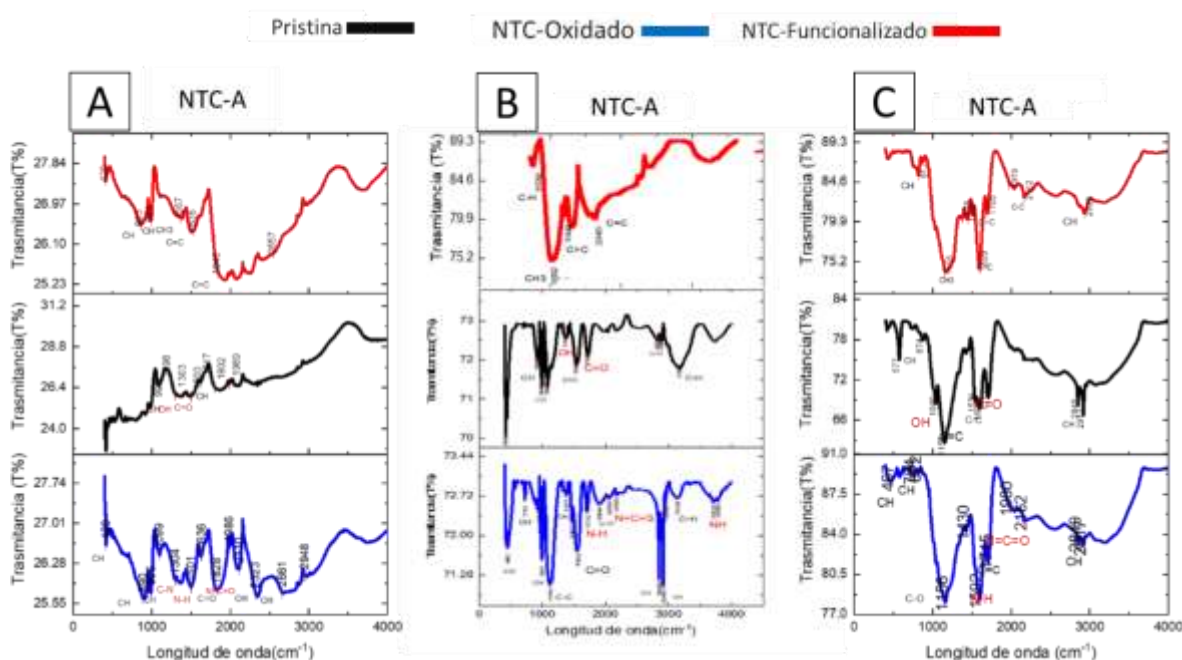


Figura 6.- FTIR de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

- **6.1.3 Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las micrografías de los NTC-A obtenidas por SEM, muestran un cambio tanto en la morfología como en la aglomeración de las NTC oxidadas y funcionalizadas a diferencia de las que no se les realizó ningún tratamiento (**figura 7**), también en la NTC-A-funcionalizado se muestran áreas con mayor brillo esto podría explicarse debido a la fluorescencia de la molécula de **FITC** unidas al NTC.

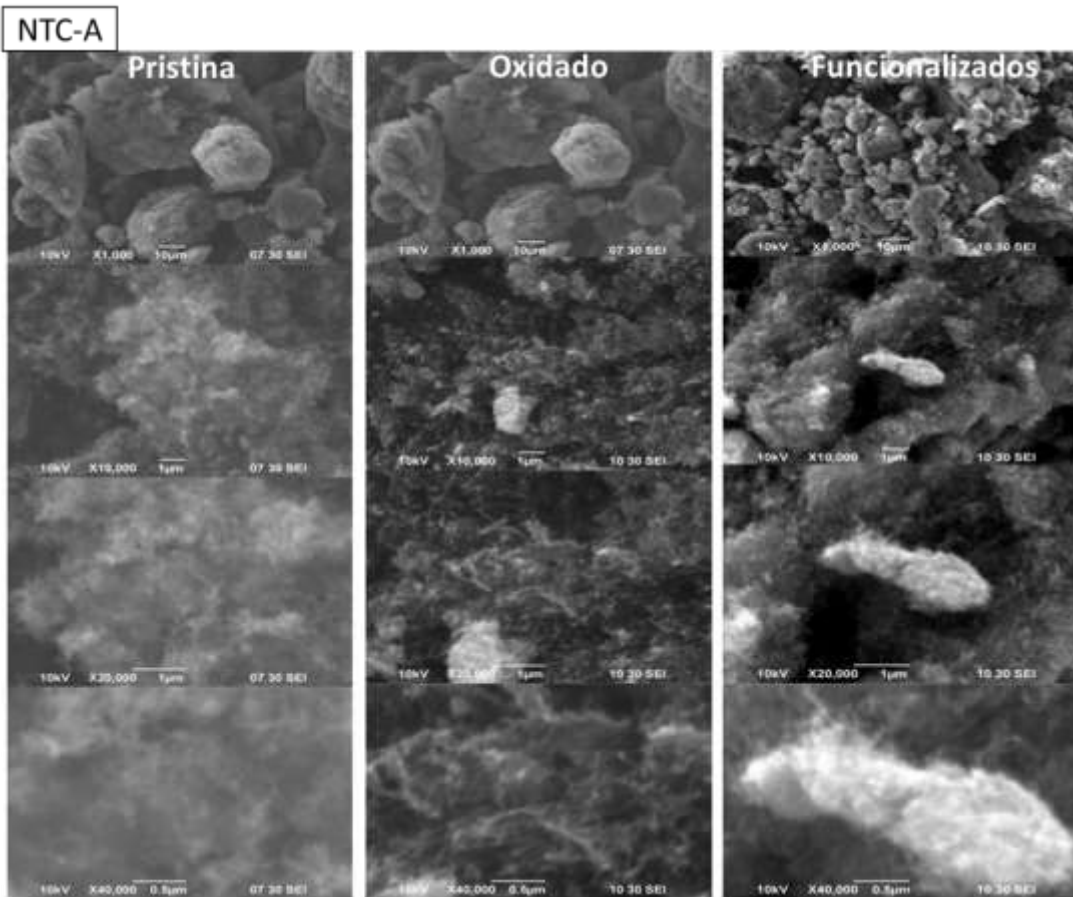


Figura 7.- Micrografía SEM de nanotubos de **carbono A** sintéticos y naturales con y sin funcionalizar con FITC, obtenidas a 10Kv X1000,10,000,20,000 y 40,000 07 30 y 10 30 SEI, la línea representa la escala 10,1 y 0.5 μm .

Las micrografías de los NTC-B obtenidas por SEM, muestran un cambio tanto en la morfología como en la aglomeración de las NTC pristina, oxidadas y funcionalizadas (**figura 8**), también en los NTC-A funcionalizados, se detectaron áreas con mayor brillo esto podría explicarse debido a la fluorescencia de la molécula de **FITC**.

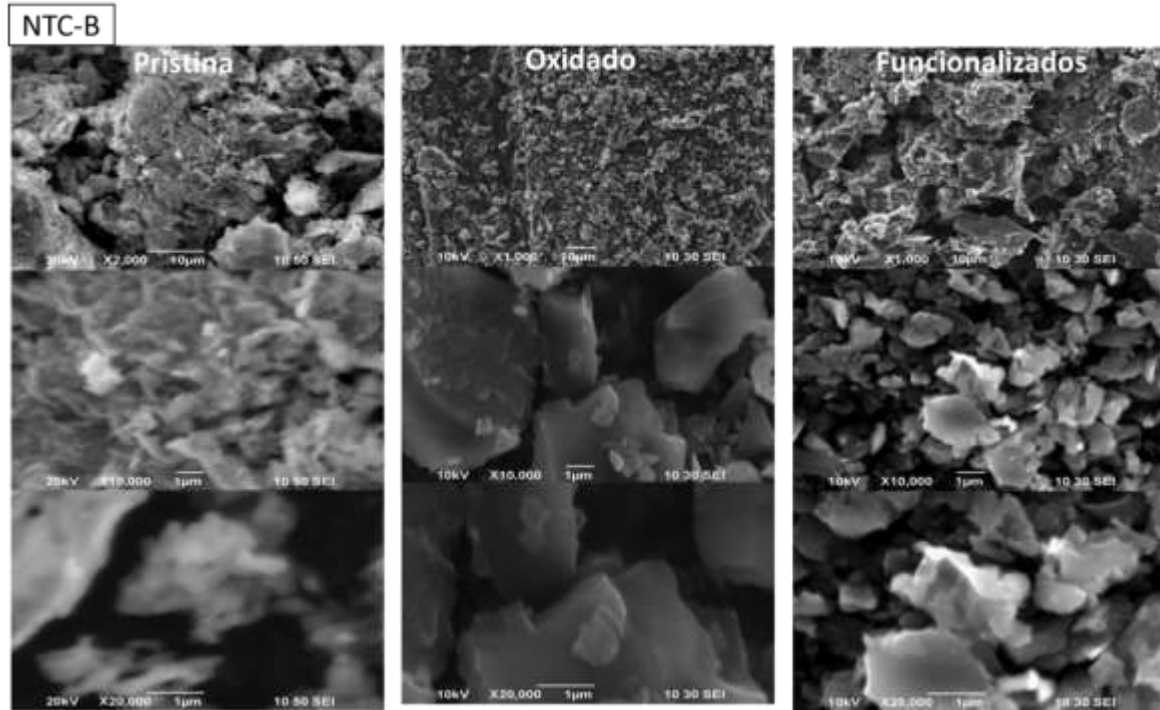


Figura 8.- Micrografía SEM de nanotubos de **carbono B** sintéticos y naturales con y sin funcionalizar con FITC, obtenidas a 20 y 10Kv X1000,10,000 y 20,000 10 50 y 10 30 SEI, la línea representa la escala 10 y 1 μm .

Las micrografías de los NTC-C (de origen natural) obtenidas por SEM, muestran un cambio tanto en la morfología como en la aglomeración de las NTC pristina, oxidadas y funcionalizadas (**figura 9**)

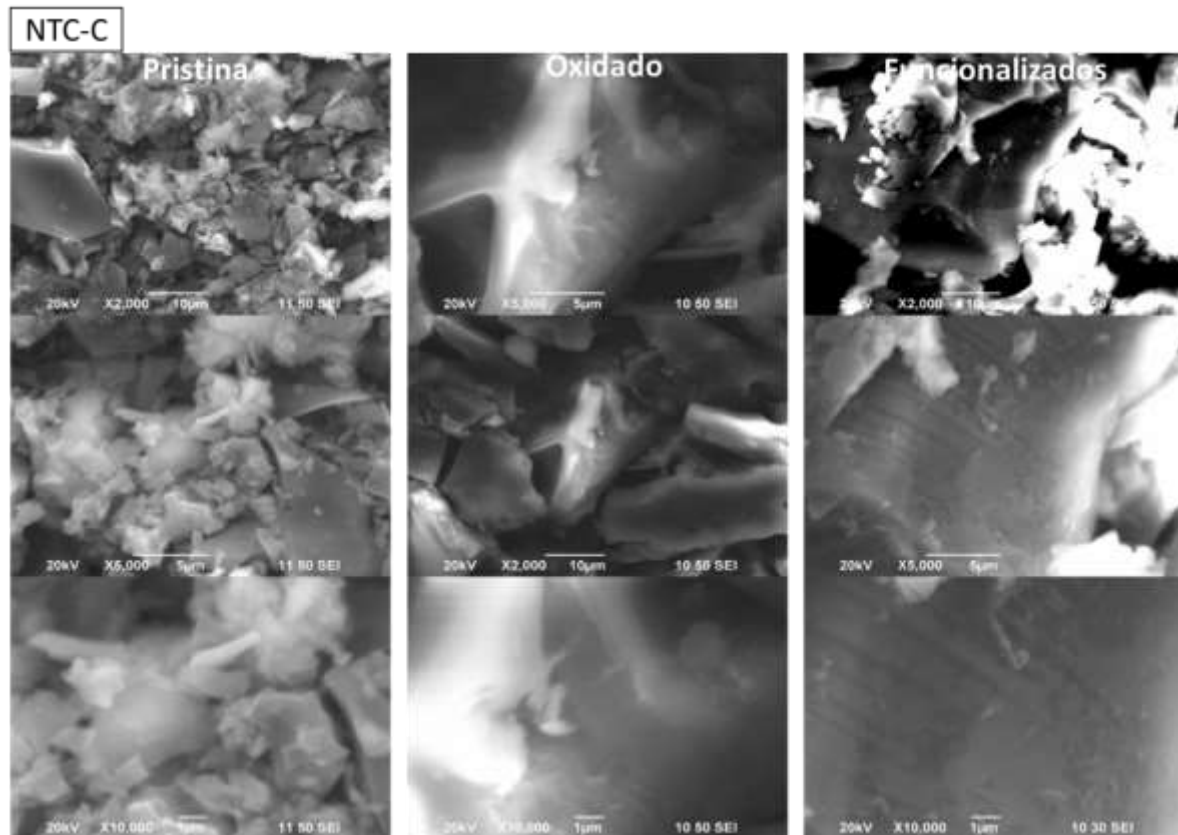


Figura 9.- Micrografía SEM de nanotubos de **carbono C sintéticos y naturales** con y sin funcionalizar con FITC, obtenidas a 20Kv X2000,5000 y 10,000 11 50, 10 50 y 10 30 SEI, la línea representa la escala 10,5 y 1 µm.

ETAPA II. Bioensayos de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar

• 6.1.4 Efecto de los NTC naturales y sintéticos en la germinación de *Avena sativa*

Los resultados de la germinación (tabla 2) mostraron que con la adición de NTC-A (pristina, oxidado y funcionalizado), se obtuvo un efecto de emergencia temprana de la semilla, al día 4 se mostró un aumento del porcentaje en todos los tratamientos con respecto al control, siendo los más altos NTC-A-oxidado a concentraciones de 2.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, al día 6 la mayoría de los tratamientos tuvieron un mayor porcentaje de germinación que la semilla control; con los NTC-A a 20 $\mu\text{g/mL}$ se alcanzó el 100% de la germinación, por último al día 8 solo los tratamientos NTC-A-oxidados a 5 $\mu\text{g/mL}$ y NTC-A-funcionalizados a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ fueron inferiores o igual al control. Mientras que los NTC-A a 2.5, 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$; NTC-A-oxidado a 2.5 y 20 $\mu\text{g/mL}$; NTC-A-funcionalizado a 5 $\mu\text{g/mL}$ alcanzaron un 100% de la germinación, comparados al 87% de la semilla control.

Tabla 2.- Germinación de *Avena sativa* cultivada con 0,2.5,5,10,20 $\mu\text{g/mL}$ de NTC-A sin tratamiento (pristina), oxidados y funcionalizados con FITC.

		Días después de la siembra			
NTC-A ($\mu\text{g/mL}$)		0	4	6	8
		Porcentaje de germinación (%)			
Pristina	Control	0	20	73	87
	2.5	0	60	60	100
	5	0	27	93	100
	10	0	27	93	93
	20	0	33	100	100
Oxidado	2.5	0	73	93	100
	5	0	47	80	80
	10	0	72	93	93
	20	0	27	67	100
Funcionalizado	2.5	0	27	67	80
	5	0	33	87	100
	10	0	27	93	93
	20	0	33	53	87

Los resultados de la germinación de *Avena sativa* con NTC-B, NTC-B-oxidado y NTC-B-funcionalizado (tabla 3), mostraron que estos NTC estimularon la emergencia temprana de la semilla desde el día 4, donde la semilla control tiene un 20% de germinación, comparado a los tratamientos donde se obtuvo porcentajes de germinación del 27% hasta un 67% de emergencia. Al día 6 los NTC-pristina en concentraciones de 2.5 y 5 µg/mL tuvieron un % de germinación inferior al control, sin embargo, en todos los demás tratamientos el porcentaje fue superior, donde el tratamiento con NTC-B-funcionalizado a 10 µg/mL alcanzó el 100% de la germinación; por último, al día 8, la semilla con NTC-B a 2.5 y 20 µg/mL; NTC-A-oxidado a 2.5 µg/mL y NTC-B-funcionalizado a 20 µg/mL fueron inferiores o igual que el control, mientras que con los demás tratamientos hubo un claro efecto de estas NPs sobre la germinación de avena, al alcanzarse de un 93 a un 100% de germinación, comparado a la semilla control con un 87%.

Tabla 3.- Germinación de *Avena sativa* cultivada con 0,2.5,5,10,20 µg/mL de NTC-B sin tratamiento (pristina), oxidados y funcionalizados con FITC.

		Días después de la siembra			
NTC-B (µg/mL)		0	4	6	8
		Porcentaje de germinación (%)			
Pristina	Control	0	20	73	87
	2.5	0	20	67	87
	5	0	53	60	100
	10	0	67	87	93
Oxidado	20	0	47	80	80
	2.5	0	47	80	87
	5	0	33	93	100
	10	0	33	93	93
Funcionalizado	20	0	27	93	93
	2.5	0	27	87	100
	5	0	73	87	100
	10	0	60	100	100
	20	0	47	87	87

Los resultados de la germinación con la adición de NTC-C, NTC-C-oxidado y NTC-C-funcionalizado (tabla 4), mostraron un efecto de emergencia temprana de la radícula, al día 4 se mostró un aumento del porcentaje en todos los tratamientos con respecto al control, excepto NTC-C a 2.5 µg/mL, siendo el más alto NTC-C a concentraciones de 20 µg/mL, al día 6 la mayoría de los tratamientos mostraron mayor porcentaje de germinación con respecto del control, en el caso de NTC-C a 5 µg/ml, NTC-C-oxidado a 5 µg/ml y NTC-C-funcionalizado a 5 µg/ml llegaron al 100% de la germinación, por último, el día 8, 4 tratamientos se quedaron por debajo del control o lo igualaron, siendo NTC-C a 2.5, 10 y 20 µg/mL y NTC-C-funcionalizado a 2.5 µg/mL, por su lado los tratamientos NTC-C a 5 µg/mL; NTC-C-oxidado a 5 µg/mL; NTC-C-funcionalizado a 5 µg/mL llegaron al 100% de la germinación, los demás tratamientos mostraron un mayor porcentaje de germinación comparado con la semilla control.

Tabla 4.- Germinación de *Avena sativa* cultivada con 0,2.5,5,10,20 µg/mL de NTC-C sin tratamiento (pristina), oxidados y funcionalizados con FITC.

	Días después de la siembra				
	NTC-C (µg/mL)	0	4	6	8
Pristina		Porcentaje de germinación (%)			
	Control	0	20	73	87
	2.5	0	20	67	87
	5	0	33	100	100
Oxidado	10	0	60	80	80
	20	0	67	87	87
	2.5	0	40	87	93
	5	0	33	100	100
Funcionalizado	10	0	60	87	93
	20	0	40	87	93
	2.5	0	40	53	67
	5	0	27	100	100
	10	0	40	80	93
	20	0	47	93	93

6.1.5 Efecto de los nanotubos de carbono naturales y sintéticos en el crecimiento de *Avena sativa*

En la **figura 10** se muestran fotografías representativas del crecimiento de plántulas de *Avena sativa* cultivada en interacción con NTC-A (pristina, oxidados y funcionalizados) a 40 días de crecimiento, donde podemos observar diferencias claras en la estructura radical tanto en el largo de la raíz como en el número de raíces secundarias con respecto al control, en el caso de NTC-A-pristina la que tiene mejores resultados en la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, por el contrario en NTC-A-oxidados muestran mejores resultados en las concentraciones bajas de 2.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, a 20 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo una inhibición del crecimiento vegetal, esto puede ser debido a los cambios estructurales del NTC como consecuencia de la oxidación, por último, el crecimiento de Avena con los NTC-A-funcionalizados se observó la misma tendencia en el crecimiento que en las plántulas cultivadas con el NTC-A-pristina, teniendo los mejores resultados en 20 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte en el área foliar vemos un incremento en el tamaño y una coloración con un verde más fuerte en los tratamientos pristina 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$; oxidado 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ y funcionalizado 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control.

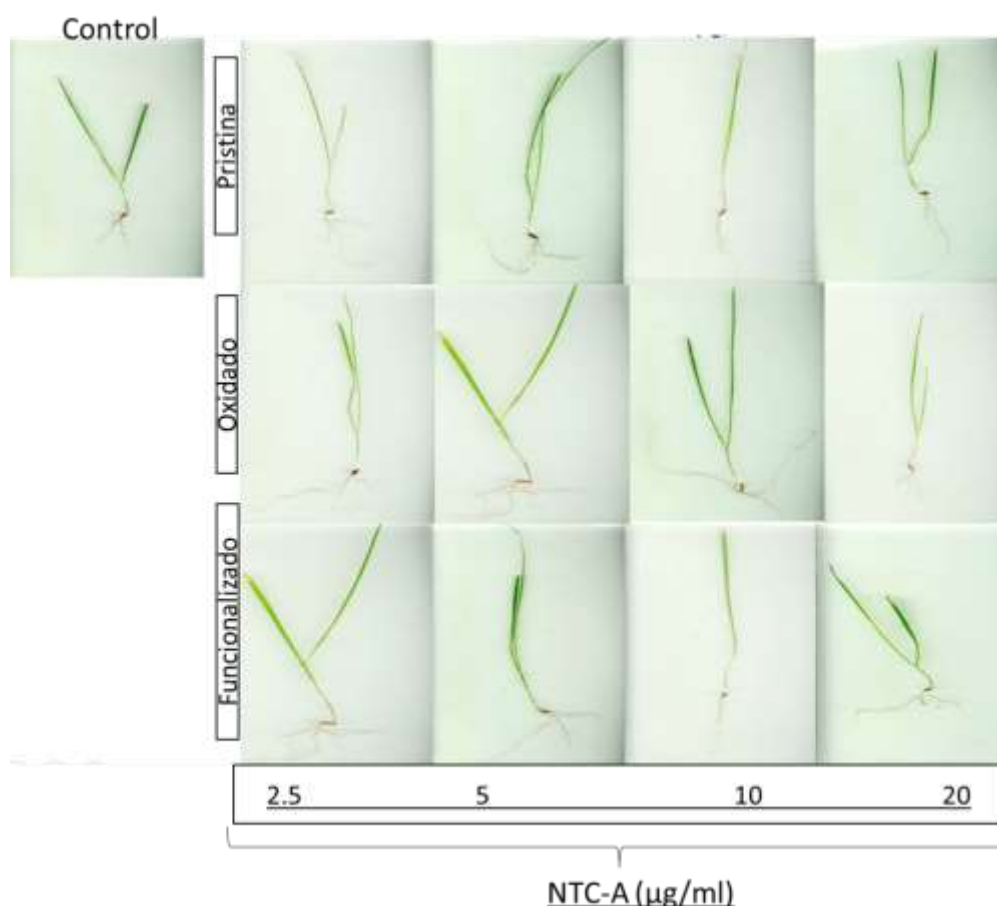


Figura 10.- Imágenes que muestran el efecto de NTC A (prístina, oxidados y funcionalizados) en el crecimiento de *Avena sativa* a los 40 días después de la siembra.

En la **figura 11** se muestran fotografías representativas del bioensayo de la interacción de NTC-B (prístina, oxidados y funcionalizados) en *Avena sativa* a 40 días de crecimiento, donde podemos observar diferencias en la estructura radical tanto la longitud de la raíz como en el número de raíces secundarias con respecto al control, mientras que con NTC-B-prístina la que tiene mejores resultados en la concentración de 5,10 y 20 µg/mL, por el contrario en NTC-B-oxidado muestra mejores resultados en las concentraciones bajas de 2.5 y 5 µg/mL en el caso de 20 µg/mL se obtuvo un resultado negativo esto puede ser debido a los cambios estructurales de la NTC, por último en los NTC-B-funcionalizado se observa una mejor estructura radical que va directamente proporcional a la concentración. Por su parte en el área foliar podemos ver diferencias en la intensidad de verde en las hojas.



Figura 11.- Imágenes que muestran el efecto de NTC B (prístina, oxidados y funcionalizados) en el crecimiento de *Avena sativa* a los 40 días después de la siembra.

En la **figura 12** se muestran fotografías representativas del bioensayo de la interacción de NTC-C (prístina, oxidados y funcionalizados) en *Avena sativa* a los 40 días después de la siembra, donde podemos observar diferencias en la estructura radical tanto en la longitud de la raíz como en el número de raíces secundarias con respecto al control, mientras que con NTC-C-Pristina existe una estructura radical consistente entre los tratamientos estando todos por encima del control, por el contrario en NTC-C-oxidado muestra mejores resultados en las concentraciones bajas de 2.5 y 5 µg/mL y a partir de 10 µg/mL se muestra una menor longitud en las raíces así como menos raíces secundarias, por último en los NTC-C-funcionalizado se observa mejor estructura radical en las concentraciones 2.5, 5 y 10 µg/mL. Por otra parte, el área foliar se vio modificada en color y tamaño siendo el tratamiento prístina con mejores resultados con respecto al control en cada concentración, con la adición de NTC oxidado se nota una disminución de la longitud del follaje dependiente de la

concentración, en tanto que con los NTC-C-funcionalizados se nota un constante el aumento del área foliar, así como un color verde intenso.

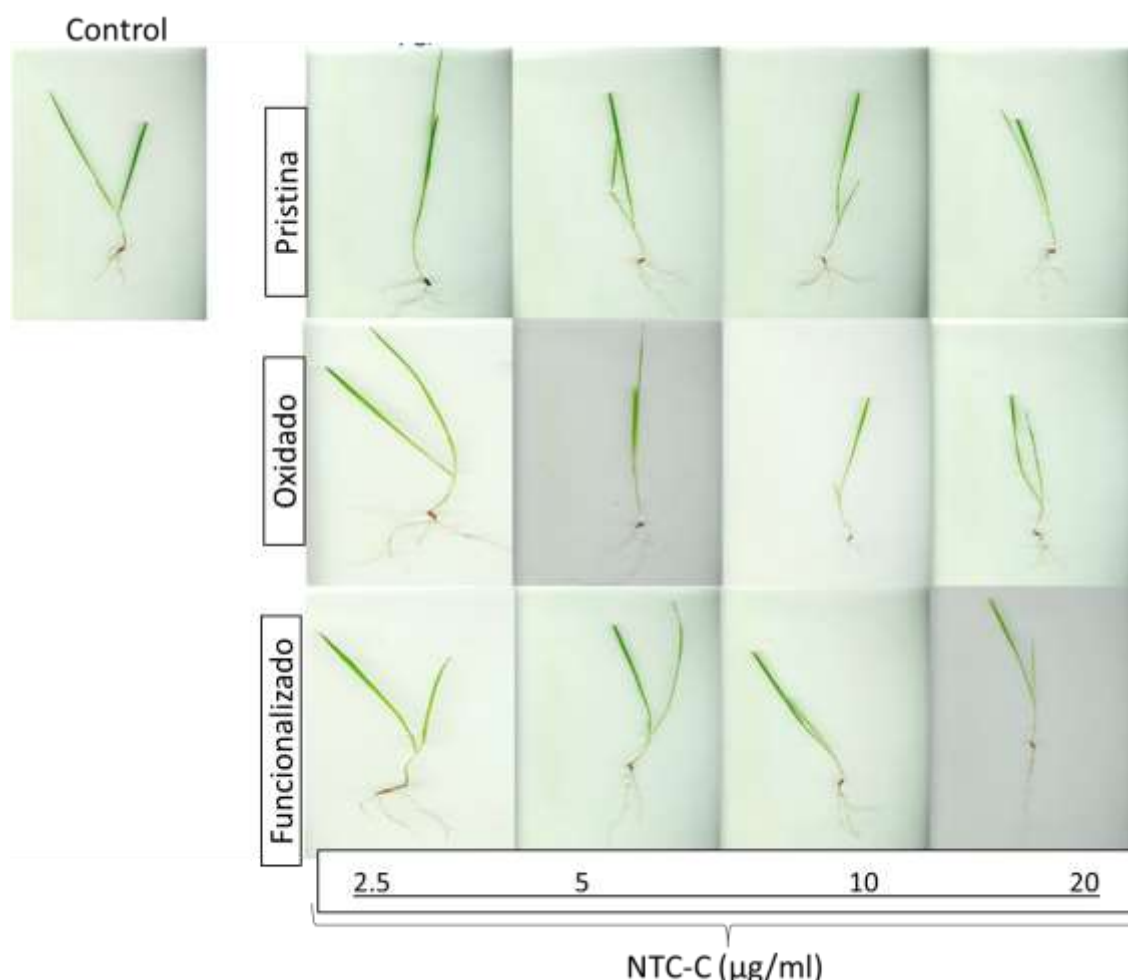


Figura 12.- Imágenes que muestran el efecto de NTC C (prístina, oxidados y funcionalizados) en el crecimiento de *Avena sativa* a los 40 días después de la siembra.

6.1.6 Efecto de los NTC en la estructura foliar de *Avena sativa*.

Al evaluar la altura de las plántulas de avena, pudimos determinar que con la adición de NTC-A-prístina el tratamiento de 5 $\mu\text{g/mL}$ fue significativamente superior que las plántulas control, mientras que con los NTC-A-oxidados, fue con 10 $\mu\text{g/mL}$ donde se observaron plántulas con mayor altura, por su parte, al adicionar la nanopartícula B, los tratamientos que tuvieron diferencias significativas fueron NTC-B-oxidado 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$ y NTC-C-prístina a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ comparado con el control.

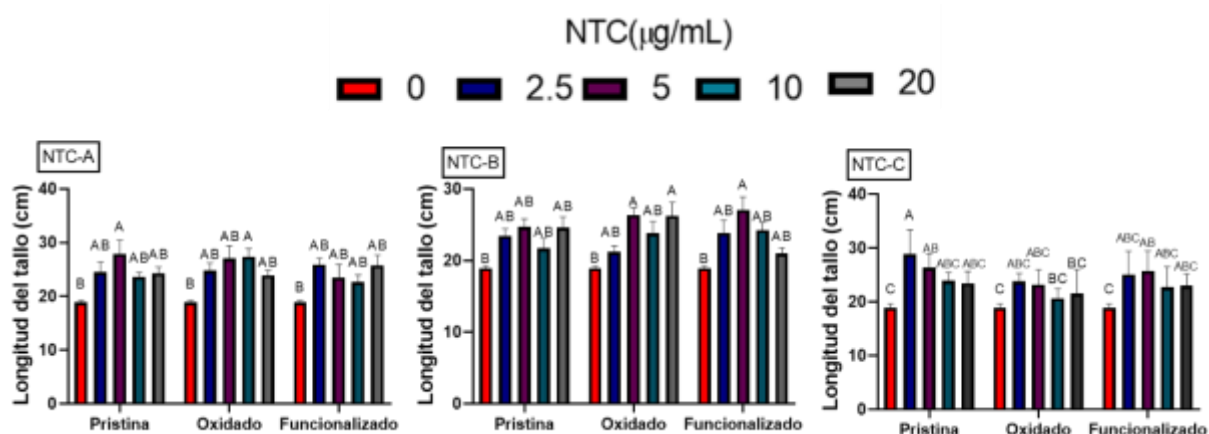


Figura 13.- Longitud de plántulas de Avena sativa cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

6.1.7 Efecto de los NTC en la arquitectura radical

Para evaluar los efectos de los NTC sintéticos y naturales antes y después de su funcionalizados con FITC sobre la arquitectura radical en *Avena sativa* 40 días después de la siembra (**figura 14**). Se midió la longitud de la raíz principal, donde se observó que con la adición de NTC-A-oxidado a 2.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, NTC-A-funcionalizado 20 $\mu\text{g/mL}$ estimularon la longitud de la raíz principal radical con respecto a las plantas control. En el caso de NTC-B hubo una diferencia significativa en NTC-B-oxidado a 2.5,5 $\mu\text{g/mL}$, NTC-B-funcionalizado a 2.5 y 20 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control. Por su parte en NTC-C se obtuvo una estimulación con la adición de NTC-C-pristina a 2.5 $\mu\text{g/mL}$, NTC-C-funcionalizado a 2.5,5 $\mu\text{g/mL}$ sobre la longitud de la raíz, comparado con las plantas control.

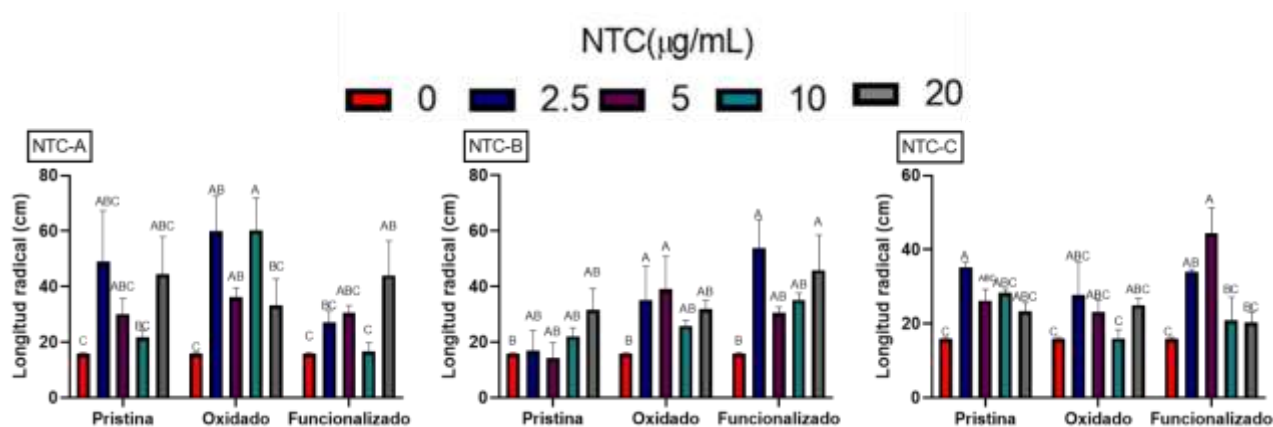


Figura 14.- Longitud radical de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

Los efectos de los NTC sintéticos y naturales antes y después de la funcionalización con FITC sobre el área radical en *Avena sativa* se evaluaron 40 días después de la siembra (**figura 15**). Los resultados mostraron que con la adición de NTC-A-oxidados a 5 µg/mL y los NTC-A-funcionalizados a 20 µg/mL estimularon el área radical de avena, comparado con las plántulas control. Mientras que los NTC-B tuvieron una diferencia significativa en NTC-B-oxidado a 20 µg/mL, NTC-B-funcionalizado a 10 y 20 µg/mL significativamente superior a las plantas control. Por su parte, con los NTC-C se obtuvo una estimulación con respecto al control en el caso de los tratamientos con NTC-C-pristina a 2.5 µg/mL, NTC-C-oxidados a 2.5 µg/mL y NTC-C-funcionalizados a 2.5,5 µg/mL, significativamente mayor que en las plántulas control.

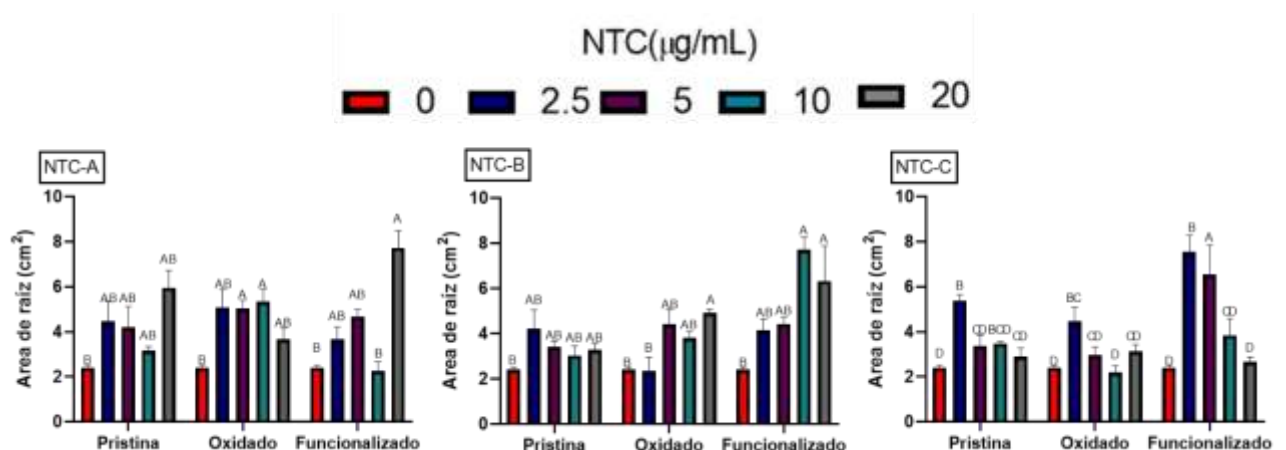


Figura 15.- Área radical de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

Los efectos de los NTC sintéticos y naturales sin tratar y funcionalizados con FITC sobre volumen radical en *Avena sativa* se evaluó a 40 días después de la siembra (figura 16). Los resultados obtenidos mostraron que la adición de NTC-A-pristina a 20 $\mu\text{g/mL}$, NTC-A-oxidado a 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, NTC-A-funcionalizado 20 $\mu\text{g/mL}$ estimularon el volumen radical con respecto a las plántulas control. Por su parte, con los NTC-C se obtuvo una estimulación del volumen radical con la adición de NTC-C-pristina y oxidado a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ y NTC-C-funcionalizado a 2.5, 5 $\mu\text{g/mL}$ con diferencias significativas con respecto a las plantas control.

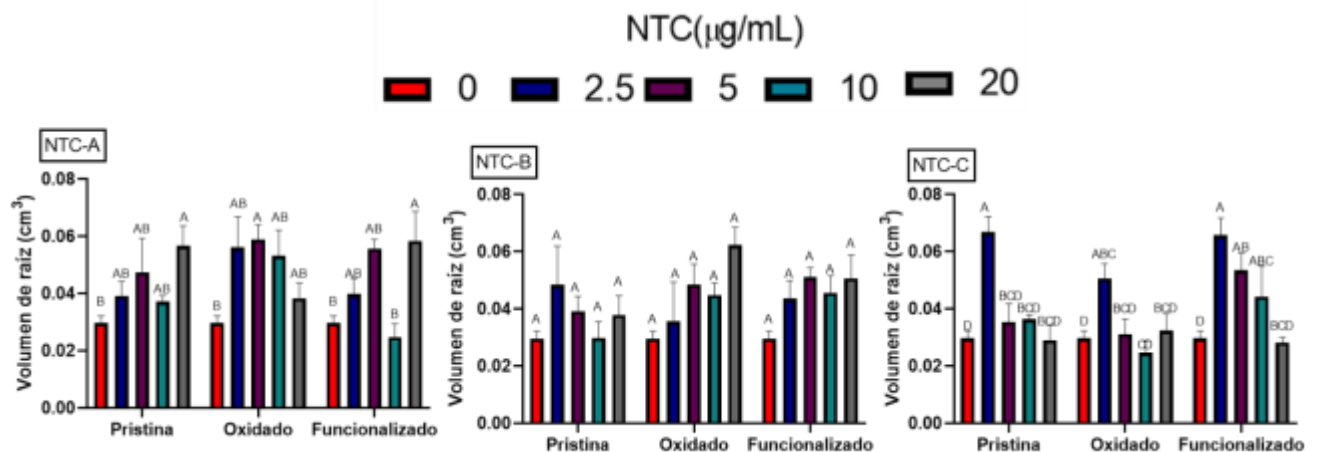


Figura 16.- Volumen radical de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

Los efectos de los NTC sintéticos y naturales antes y después de la funcionalización con FITC sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de *Avena sativa* 40 días después de la siembra se presentan en la **figura 17**. Los resultados mostraron que con la adición de NTC-A-pristina a 5 µg/mL, NTC-A-oxidado a 2.5 µg/mL, NTC-A-funcionalizado 20 µg/mL estimularon el largo de la raíz principal con respecto al observado en las plantas control. En el caso de NTC-B hubo una diferencia significativa en NTC-B-oxidados a 5 y 10 µg/mL, NTC-B-funcionalizado a 20 µg/mL con respecto al control. Por su parte, con la adición de NTC-C se observó que con la adición de NTC-C-oxidados a 5 µg/mL y NTC-C-funcionalizados a 10 µg/mL se obtuvo una estimulación sobre la longitud de la raíz, comparado con el control (**figura 17**).

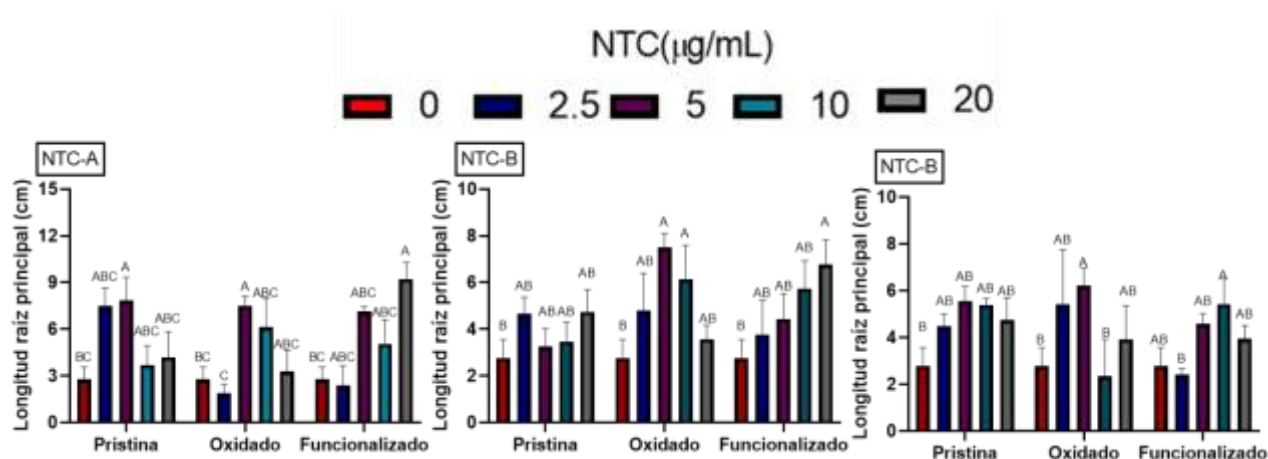


Figura 17.- Longitud de la raíz principal de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas. La barra representa σ o ET.

Al evaluar los efectos de los NTC sintéticos y naturales sin tratar y funcionalizados con FITC sobre el número de raíces laterales en *Avena sativa* de 40 días de crecimiento (**figura 18**). Se obtuvo que con la adición de NTC-A-oxidado a 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ y NTC-A-funcionalizado a 20 $\mu\text{g/mL}$ estimularon el número de raíces laterales con respecto a las plántulas del control. En el caso de NTC-B hubo una diferencia significativa en NTC-B-oxidado a 20 $\mu\text{g/mL}$, NTC-B-funcionalizado a 5,10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al control. Por su parte, con la adición de NTC-C se observó que estas nanopartículas incrementaron el número de raíces laterales, comparado con las plantas control, en el caso de los tratamientos NTC-C-pristina a 10 $\mu\text{g/mL}$, NTC-C-oxidado a 10 $\mu\text{g/mL}$ y NTC-C-funcionalizado a 5,10 $\mu\text{g/mL}$ también se observó que estas nanopartículas favorecieron significativamente la formación de raíces laterales, al compararlo con las plántulas del control (**figura 18**).

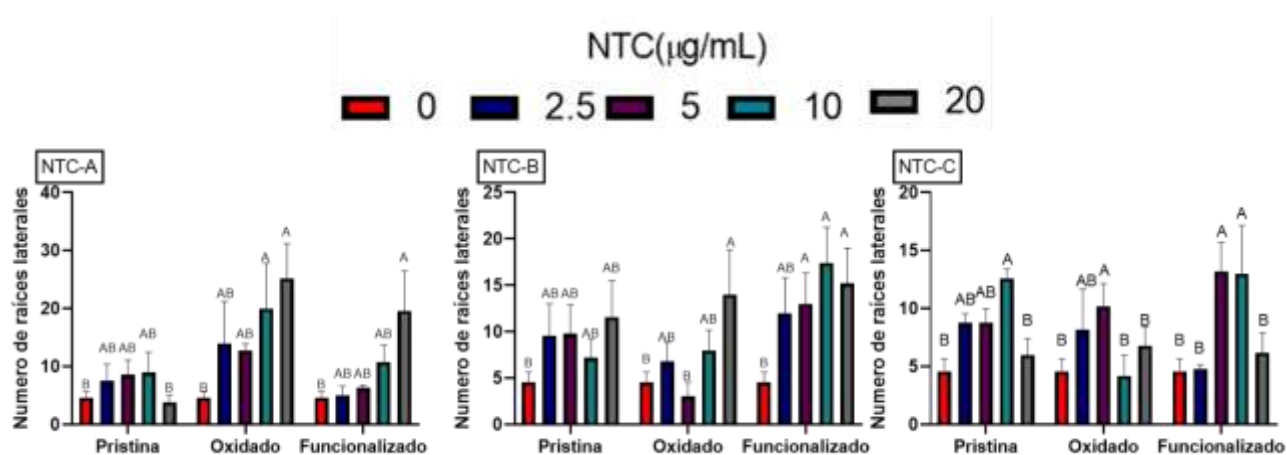


Figura 18.- Número de raíces laterales de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas. La barra representa σ o ET.

6.1.8 Efecto de los NTC en peso fresco y seco

Al evaluar los efectos de los diferentes NTC en la biomasa de avena, se observó con la adición de NTC-A pristina, oxidado y funcionalizado en *Avena sativa*, un efecto positivo sobre el peso fresco vegetal, donde en todos los tratamientos con NTC-A mostraron resultados estadísticamente superiores en las plantas vs el control, mientras que con los NTC-B, solo los tratamientos NTC-B-oxidados en concentraciones de a 2.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$ no tienen una diferencia significativa con respecto al control; en el caso de NTC-C se obtuvieron más tratamientos sin diferencias como NTC-C-pristina a 2.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$; NTC-C-oxidado a 2.5,5,10 $\mu\text{g/mL}$ y NTC-C-funcionalizado a 20 $\mu\text{g/mL}$ comparado con el control (**figura 19**).

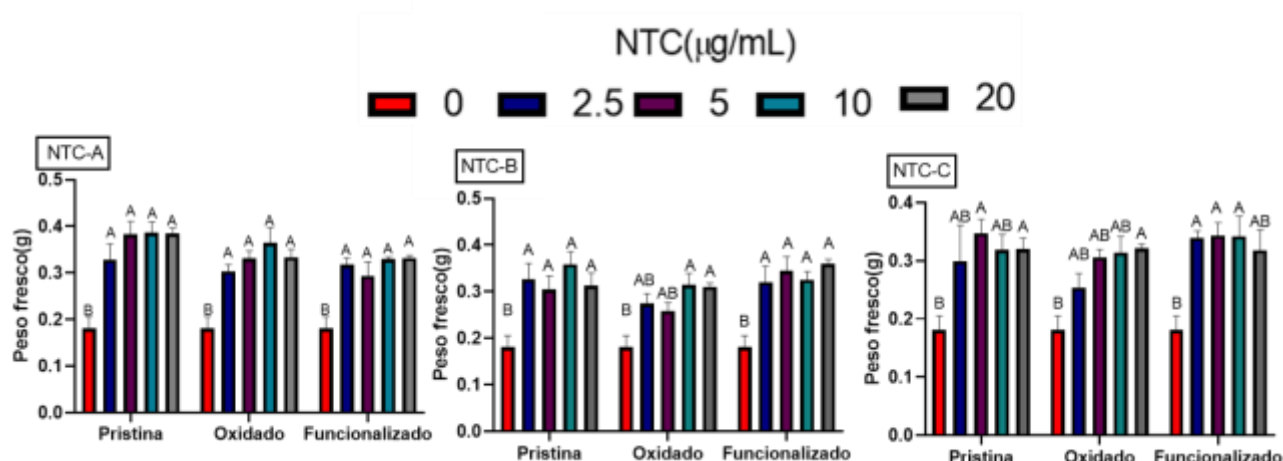


Figura 19.- Peso fresco de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas. La barra representa σ o ET.

Mientras que, al evaluar el peso seco, se observó con la adición de NTC-A pristina, oxidado y funcionalizado en *Avena sativa*, un aumento del peso seco, excepto con la adición de NTC-A-pristina a 2.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$, NTC-A-oxidado a 2.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ y en el caso de NTC-A-funcionalizado solo el 20 $\mu\text{g/mL}$ tuvo diferencia significativa con respecto al control; por su parte en NTC-B solo se obtuvieron diferencias significativas en NTC-B-oxidado 10 $\mu\text{g/mL}$, NTC-B-funcionalizado 2.5 y 20 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de NTC-C solo en NTC-C-funcionalizado a 20 $\mu\text{g/mL}$ tuvo diferencias significativas con el control (**figura 20**).

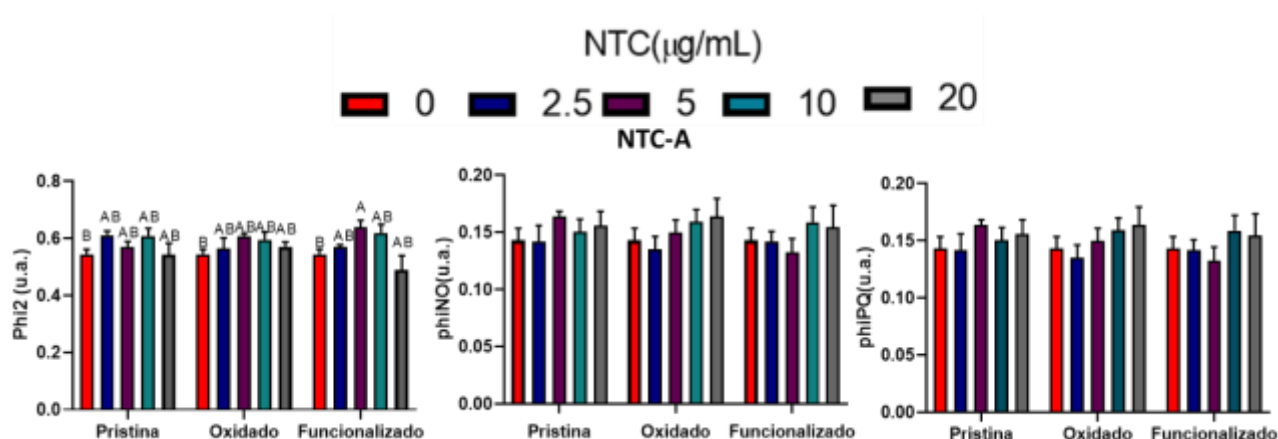


Figura 20.- Peso seco de *Avena sativa* cultivada con nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 40 días después de la siembra.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas. La barra representa σ o ET.

6.1.9 Efecto de los NTC en la tasa fotosintética

Para evaluar el efecto de los NTC en la actividad fotosintética, se midió Phi2, phiNO y phiPQ. Estos efectos sobre la tasa fotosintética se observaron principalmente en los tratamientos NTC-A-funcionalizado a 5 µg/mL, en estos tratamientos hubo un cambio significativo en Phi2, en los demás tratamientos si bien hubo una diferencia esta no fue significativa comparado con las plantas control.

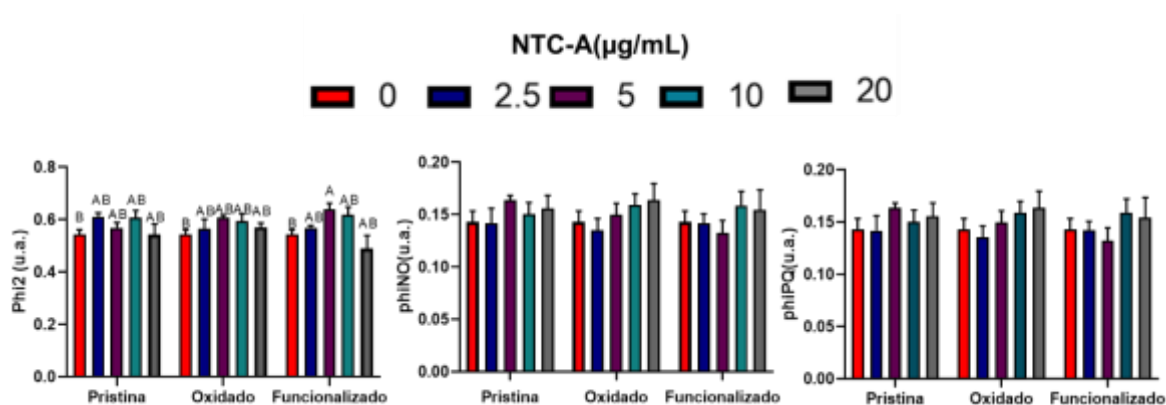


Figura 21.- Efecto de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína sobre Phi2 en *Avena sativa* después de 40 días de crecimiento.

Phi2 fue analizado con Software PhotosynQ y los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

Para evaluar el efecto de los NTC en la actividad fotosintética, se midió Phi2, phiNO y phiPQ. Estos efectos sobre la tasa fotosintética se observaron principalmente en los tratamientos NTC-B-oxidado a 2.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, en estos tratamientos hubo un cambio significativo en Phi2, en los demás tratamientos si bien hubo una diferencia esta no fue significativa comparado con las plantas control.

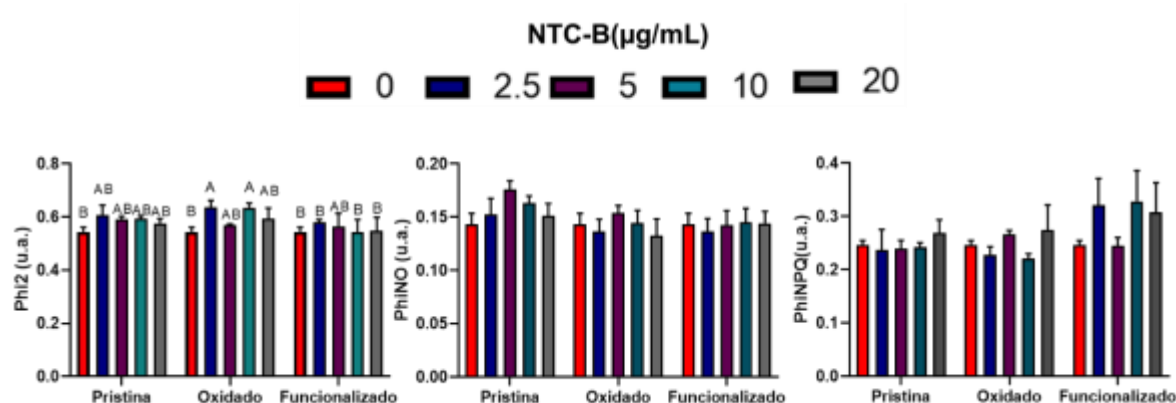


Figura 22.- Efecto de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína sobre phiNO en *Avena sativa* después de 40 días de crecimiento.

PhiNO fue analizado con Software PhotosynQ y los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

Para evaluar el efecto de los NTC en la actividad fotosintética, se midió Phi2, phiNO y phiPQ. Estos efectos sobre la tasa fotosintética se observaron principalmente en los tratamientos NTC-C-pristina a 20 µg/mL y NTC-C-oxidado a 2.5 µg/mL, en los demás tratamientos si bien hubo una diferencia esta no fue significativa comparado con las plantas control.

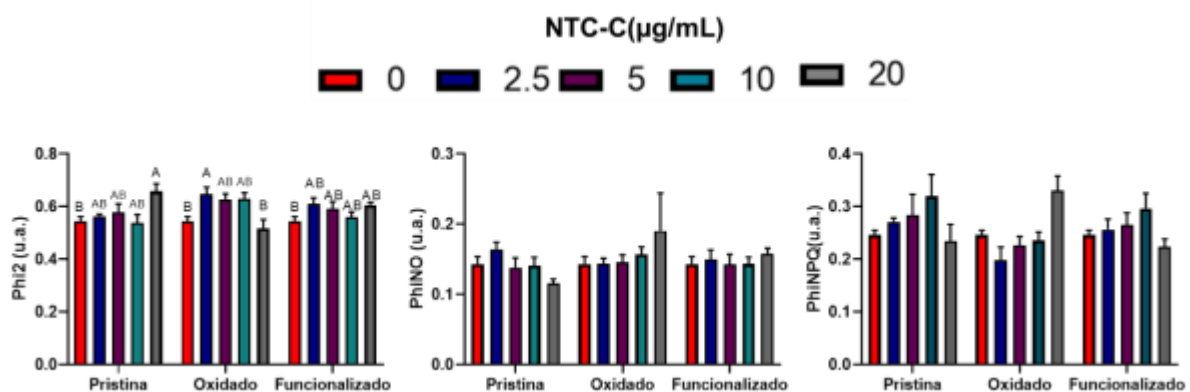


Figura 23.- Efecto de nanotubos de carbono naturales y sintéticos con y sin funcionalizar con Isotiocianato de fluoresceína sobre phiPQ en *Avena sativa* después de 40 días de crecimiento.

PhiPQ fue analizado con Software PhotosynQ y los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

6.1.10 Traslocación de NTC en tejidos vegetales

En las **figuras 24-35** se muestran imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia para evaluar la traslocación de NTC- funcionalizados con isocianato de fluoresceína al interior de la raíz. Las imágenes muestran cortes de la raíz de avena cultivada con 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de NTC A, B y C. Los resultados obtenidos muestran que tanto en la planta control (sin NTC) como en el tratamiento con adición de NTC sin funcionalizar y oxidados no se observa fluorescencia al interior del corte de raíz, por el contrario, en las imágenes correspondientes a los NTC-A funcionalizados con FITC, se observan aglomerados fluorescentes que sugieren la presencia de los NTC en el interior de la raíz de avena, señalados en el círculo blanco.

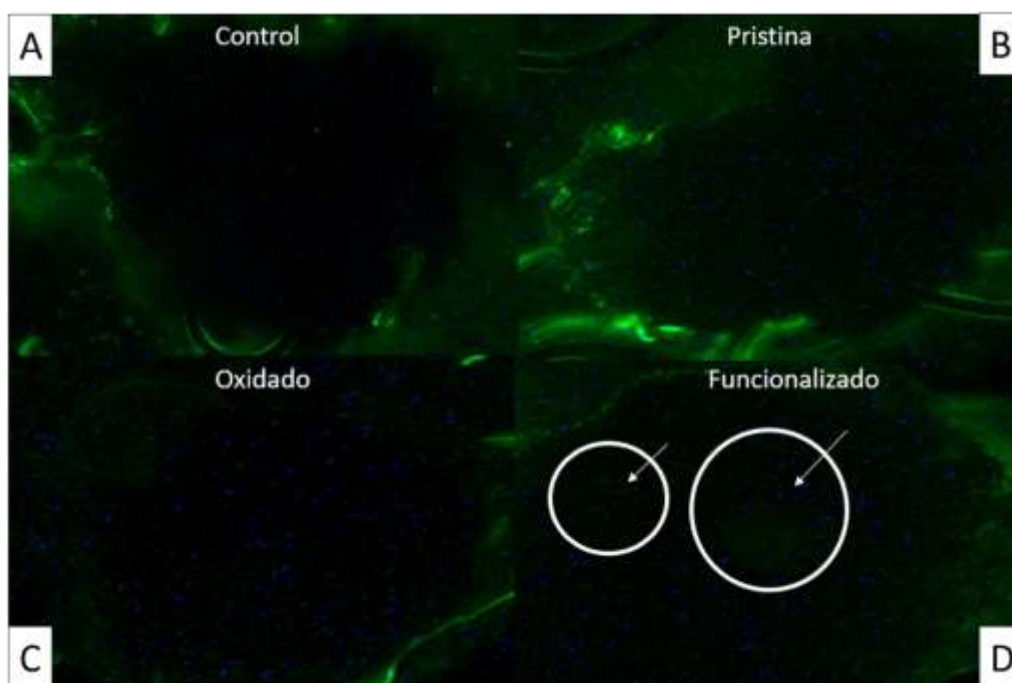


Figura 24.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ vistos en microscopio fluorescencia a 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

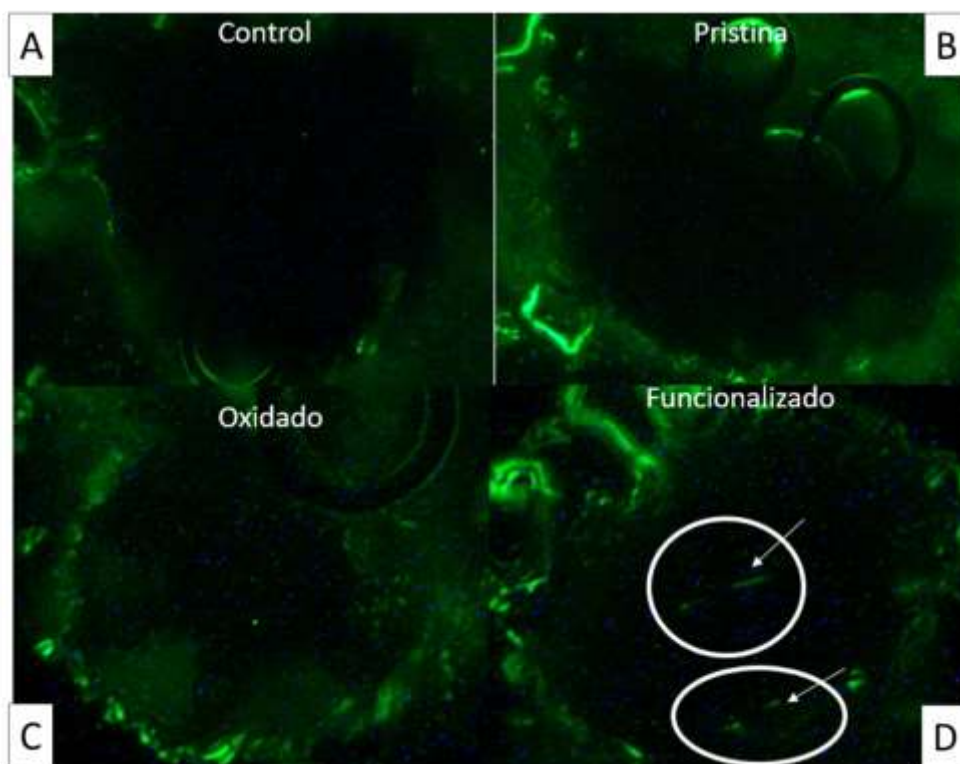


Figura 25.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 5 $\mu\text{g/mL}$ vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

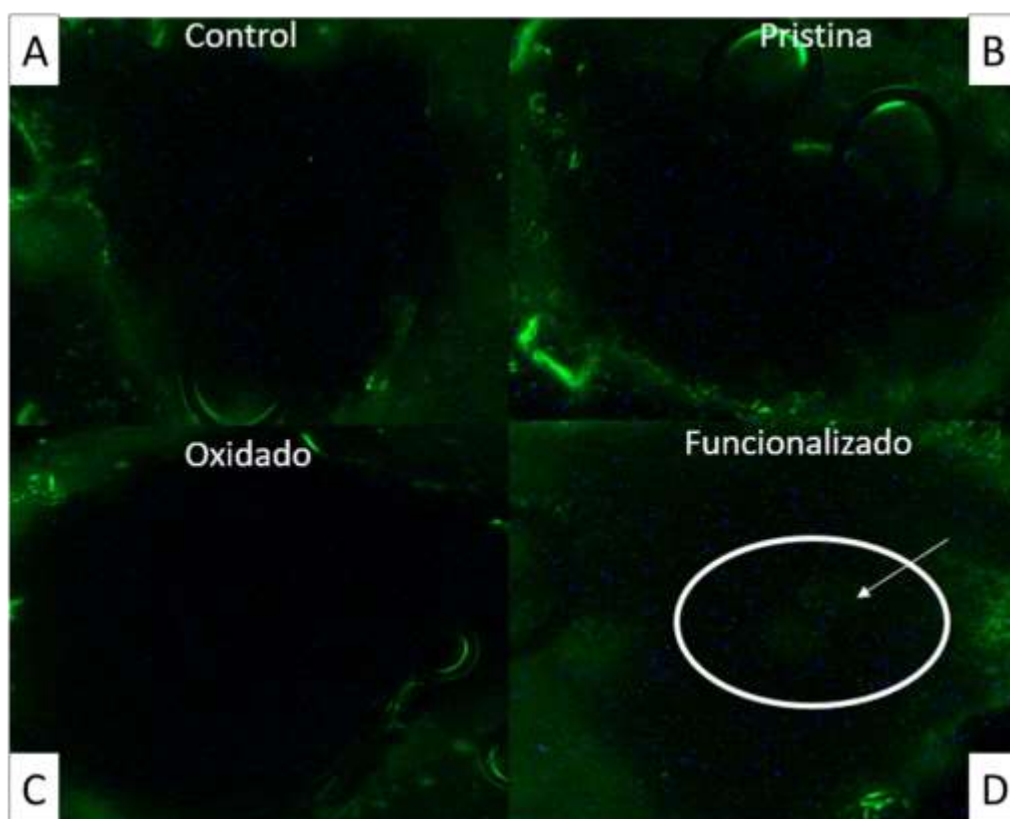


Figura 26.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 10 $\mu\text{g/mL}$ vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

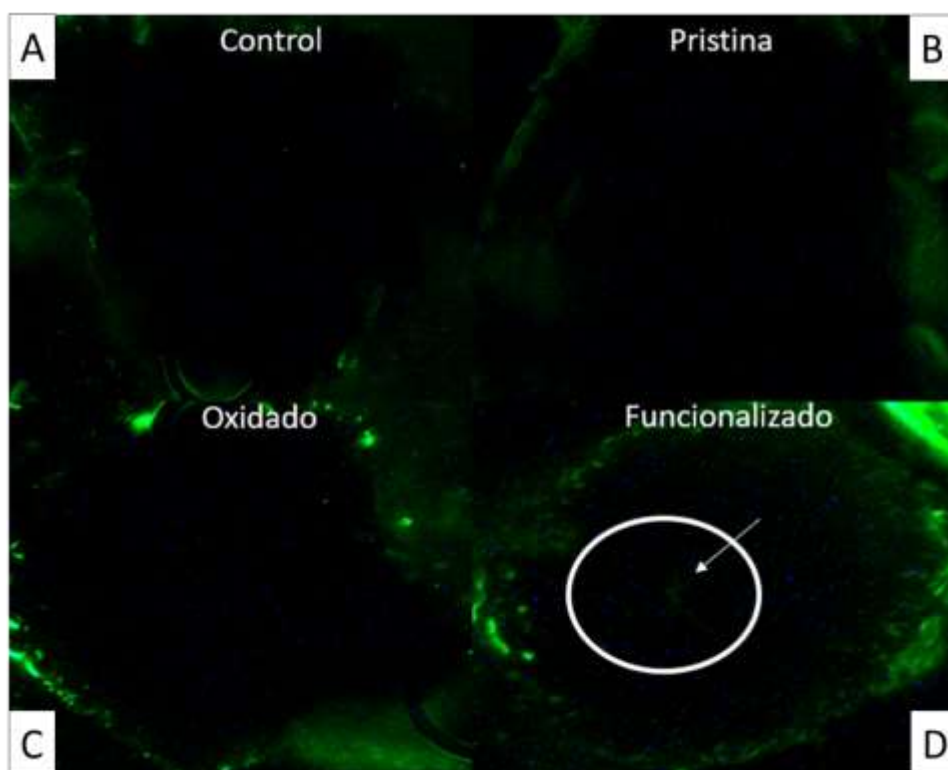


Figura 27.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-A (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 20 $\mu\text{g/mL}$ vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

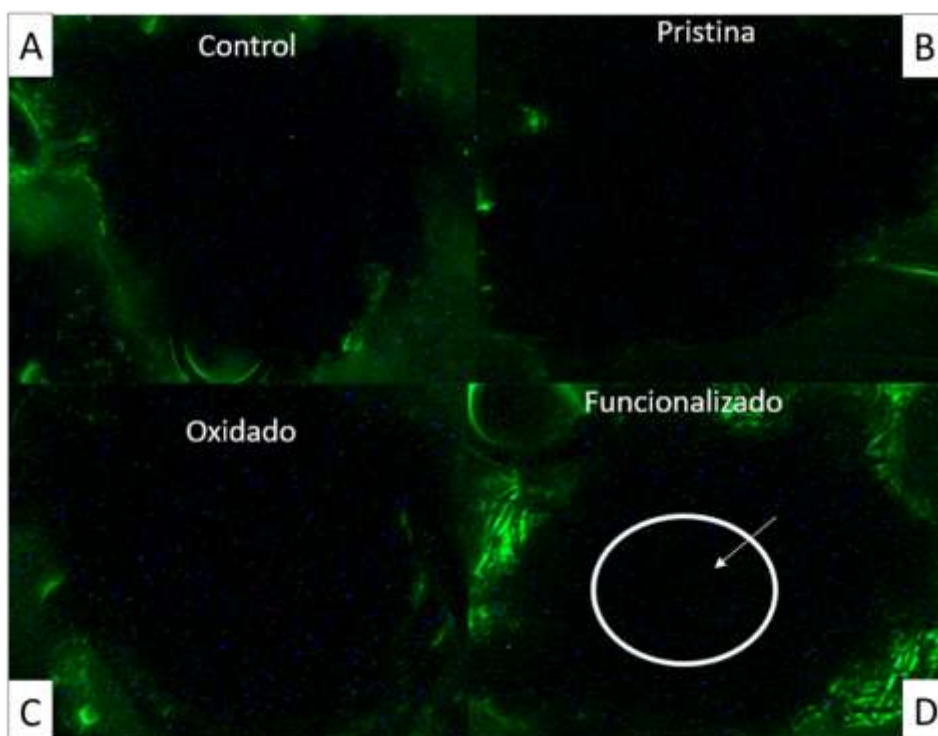


Figura 28.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 2.5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

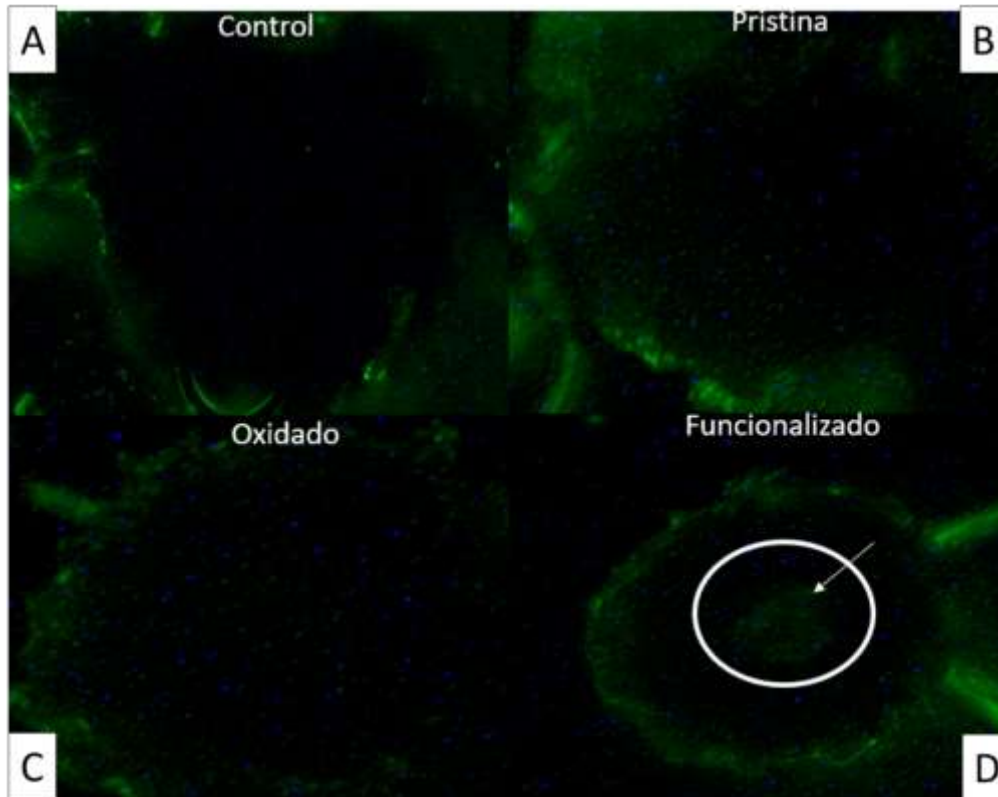


Figura 29.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

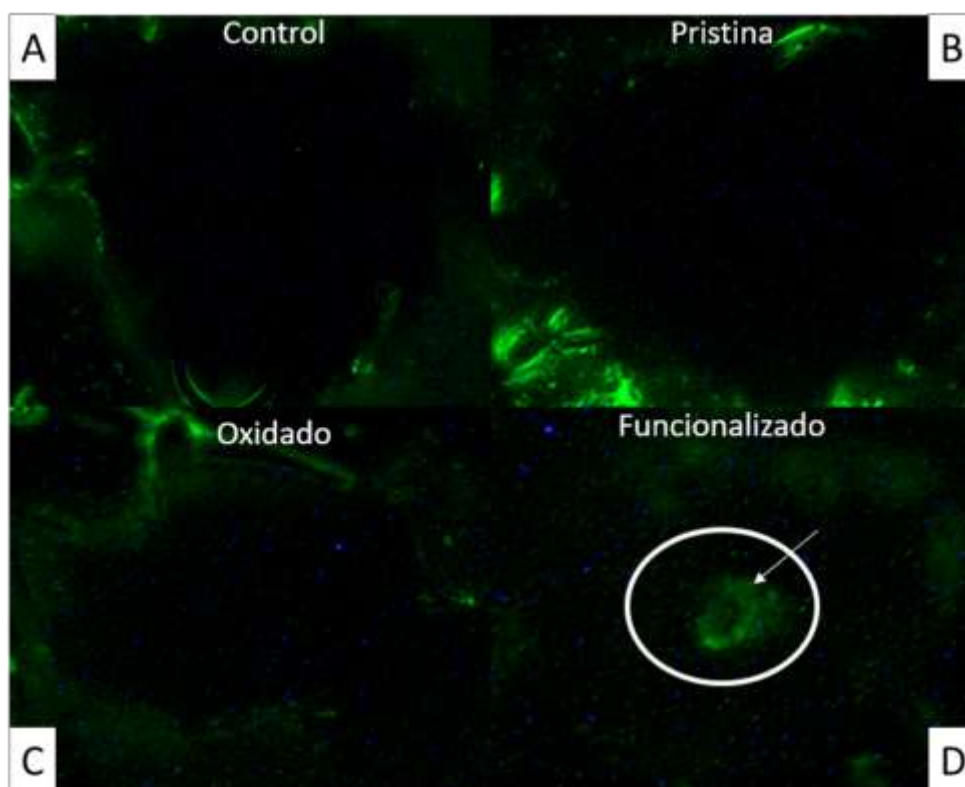


Figura 30.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 10 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

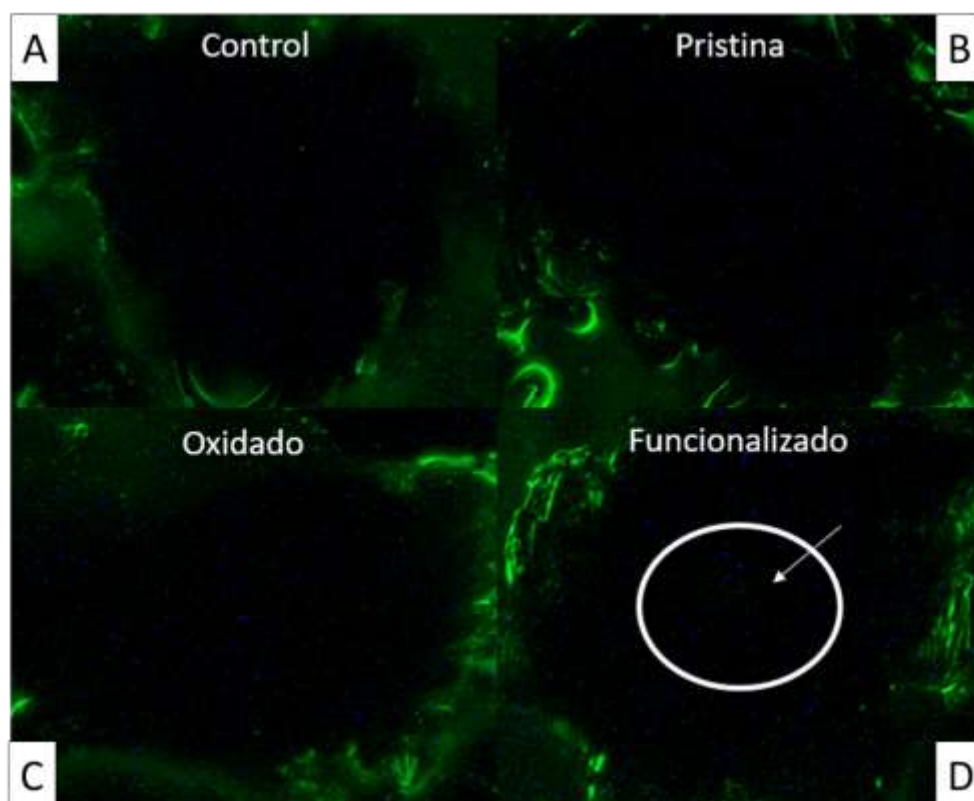


Figura 31.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-B (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 20 $\mu\text{g/mL}$ vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

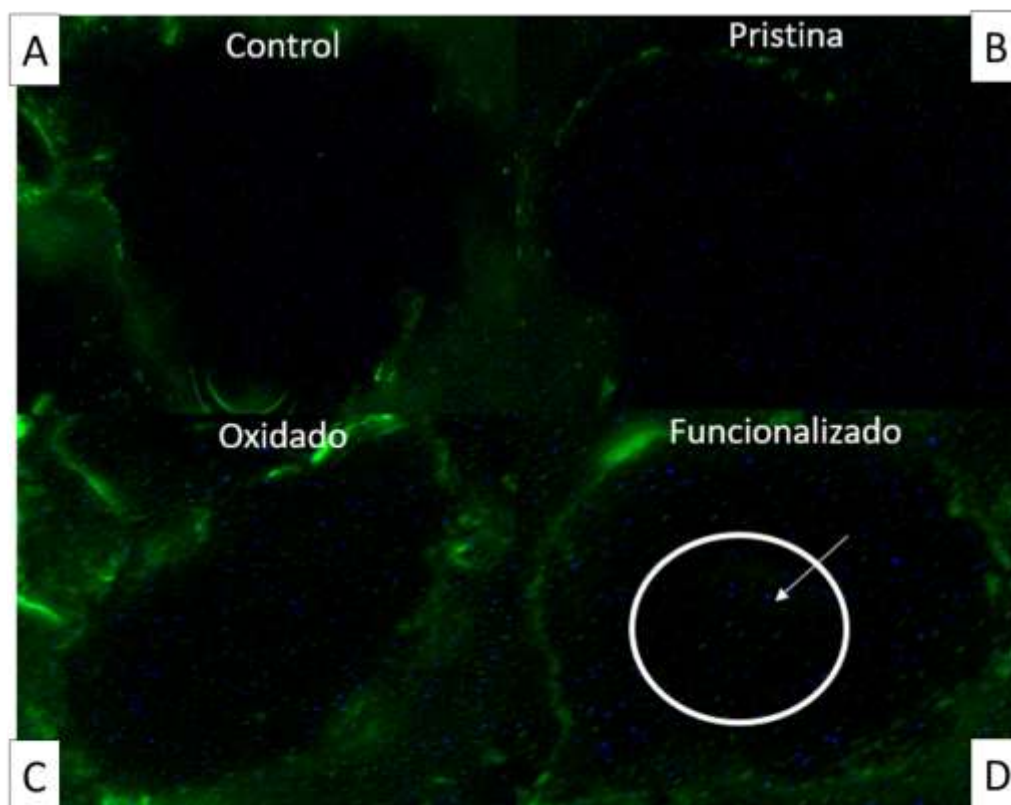


Figura 32.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

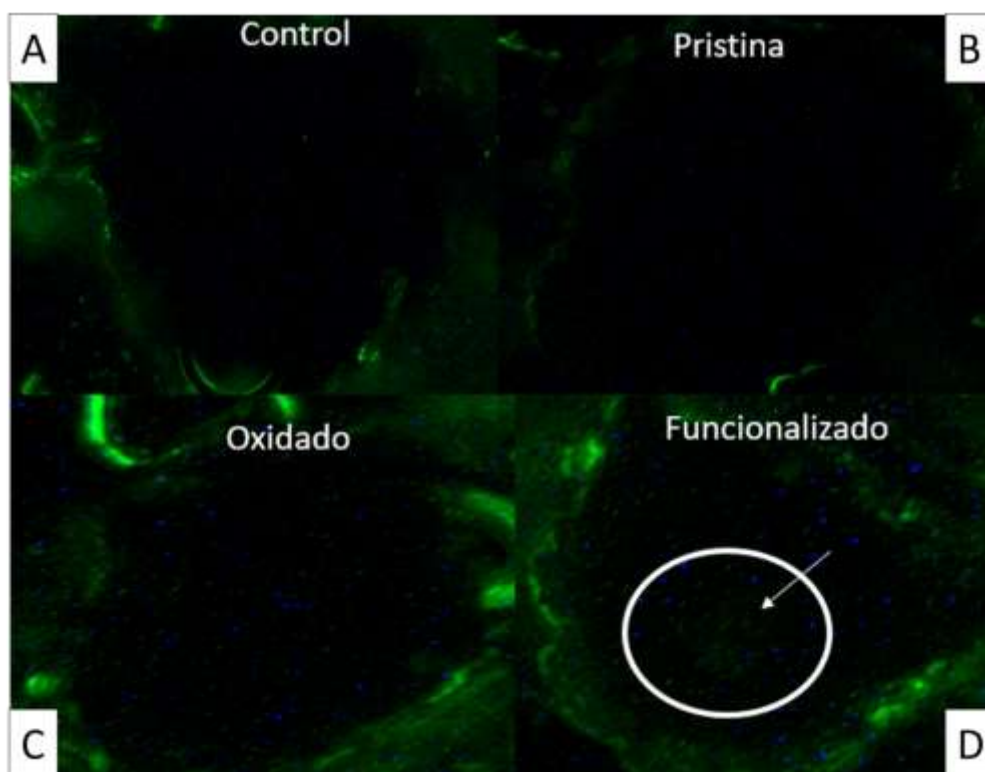


Figura 33.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 5 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

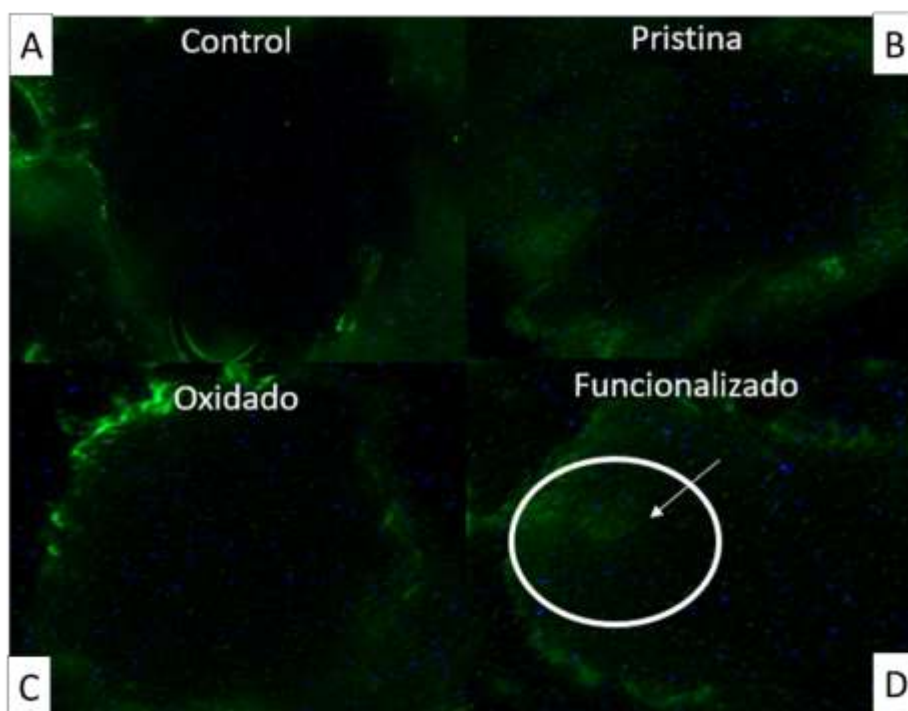


Figura 34.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 10 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

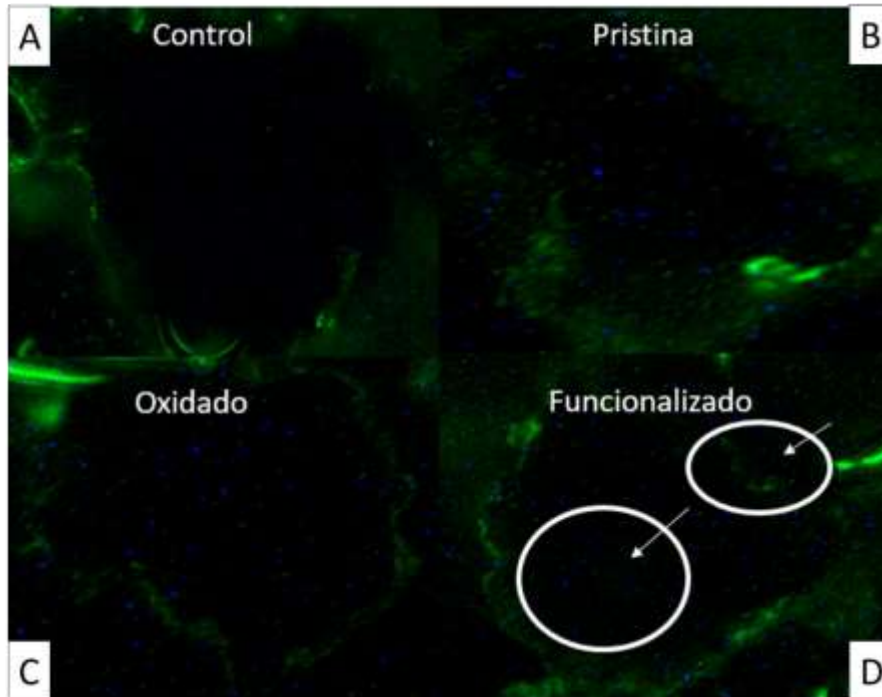


Figura 35.- Cortes histológicos de *Avena sativa* tratados con NTC-C (Pristina, oxidado y funcionalizado) a 20 µg/mL vistos en microscopio fluorescencia 4x. a) corte de raíz sin NTC, b) corte de raíz con NTC sin funcionalizar (pristina), c) corte de raíz con NTC oxidados y d) corte de raíz con NTC funcionalizados con FITC.

6.1.11 Translocación de NTC funcionalizados con FITC en la raíz de *Avena sativa*.

En la siguiente figura se muestra la cuantificación de la fluorescencia detectada en cortes histológicos de la raíz de *Avena sativa* tratadas con nanotubos de carbono A, B y C con y sin funcionalizar con FITC. Los resultados mostraron un claro aumento en el nivel de fluorescencia en las NTC A, B y C funcionalizadas con respecto a los nanotubos pristina y oxidados. En el caso de NTC-A-funcionalizado los 4 tratamientos muestran valores similares mientras que el NTC-B-funcionalizado muestra mayor intensidad en la fluorescencia emitida al adicionar 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de NTC-B, por su parte, con los NTC-C-funcionalizados se muestra una mayor fluorescencia con 5 $\mu\text{g/mL}$.

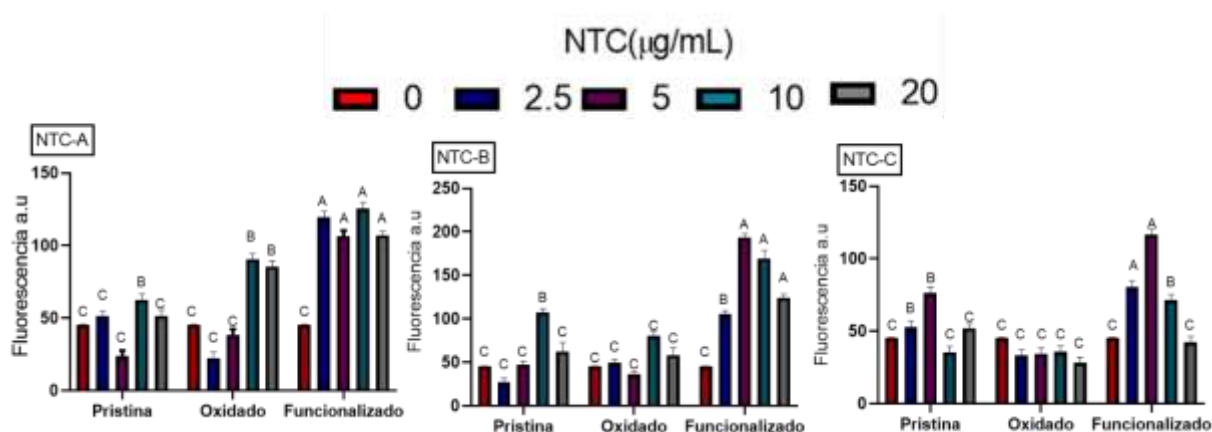


Figura 36.- Fluorescencia en la raíz de *Avena sativa* tratados con NTC Pristina, oxidados y funcionalizados con FITC en concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ obtenidos por microscopía de fluorescencia a 4x, y cuantificados en software ImageJ.

Los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

7. Discusión de resultados

En las últimas dos décadas, ampliamente se ha documentado el efecto de la interacción de las nanopartículas como los NTC en las plantas, donde se ha reportado que estas actúan positiva o negativamente sobre distintas etapas del desarrollo vegetal, desde estadios de germinación, plántula o madurez vegetal donde se han identificado cambios morfológicos, fisiológicos y estructurales, por ejemplo sobre la arquitectura radical, área foliar, metabolismo secundario, sistema antioxidante, asimilación de nutrientes y actividad fotosintética (Swift et al., 2018). Al realizar estudios sobre los posibles mecanismos y factores involucrados durante dichos procesos, se ha identificado que la respuesta de las plantas a los NTC es dependiente de la planta y condiciones de cultivo, pero también influyen la concentración y las propiedades fisicoquímicas de los NTC, así como la solubilidad o grado de dispersión de estos (Pérez et al 2017). Ampliamente se ha documentado que los NTC tienen propiedades muy específicas, a las que atribuimos los beneficios que confieren a las plantas y otros sistemas biológicos. Sin embargo, al modificar dichas características podría mejorarse su eficiencia o cambiar su actividad frente a la interacción con las plantas. Procesos químicos como la funcionalización covalente de los NTC, ha permitido mejorar la limitada solubilidad que tienen estos nanomateriales para hacerlos más compatibles con los sistemas bióticos (Andrade et al., 2012). Dicho proceso de funcionalización a través de la oxidación parcial del NTC rompe los enlaces covalentes de la estructura del grafeno que los constituye, reduciendo su cristalinidad y esto genera enlaces sencillos que les permite unirse a otras moléculas como el H₂O haciéndolos más solubles y por lo tanto, facilitar su transporte de estas NPs al interior de la planta, además estos enlaces permiten la unión de otras moléculas de interés para cada investigación, por ejemplo el isotiocianato de fluoresceína, que permite dentro de los tejidos vegetales rastrear estos nanomateriales a través de su rastro de fluorescencia (Joshi et al., 2018).

Por lo tanto, en este proyecto de investigación, se llevó a cabo la funcionalización primero para incrementar la solubilidad de los NTC y después con el objetivo de evaluar si estas nanopartículas ingresan al interior de la raíz y así confirmar su traslocación. Por lo que para confirmar la correcta funcionalización de los NTC con el isotiocianato de fluoresceína, el primer análisis que se realizó fue de espectroscopía Raman, donde se identificaron dos de los picos característicos en los NTC, la banda D que se encuentra alrededor de 1350 cm⁻¹ representa el enlace sp³ del carbono y una banda G que representa el enlace sp² del carbono alrededor de los 1600 cm⁻¹, la relación de estas dos bandas (ID/IG), nos indican la cristalinidad de los NTC (Huang et al., 2003), en el caso de los resultados que obtuvimos, pudimos confirmar que había en las 3 nanopartículas NTC A, B y C, un aumento de ID/IG (**figura 5**) en los NTC oxidados, esto puede ser debido a la ruptura parcial de la estructura del NTC, y el número disminuyó después en los NTC funcionalizados esto posiblemente por la adición del isotiocianato de fluoresceína que ocupó el lugar de la ruptura causada por la oxidación, al ocupar el lugar se disminuyeron las imperfecciones del NTC (**Figura 5**).

Complementario a espectroscopía de Raman, para confirmar la funcionalización de NTC con isotiocianato de fluoresceína las muestras se analizaron mediante FTIR (**figura 6**) donde se identificaron los grupos funcionales característicos de los NTC, donde encontramos que al oxidar los NTC se sustituyeron enlaces C-C por enlaces C=O, lo que sugiere que hubo una ruptura de la estructura del nanotubo de carbono y se realizó la oxidación por otro lado, los FTIR de los NTC funcionalizados con el compuesto fluorescente, mostraron además los grupos funcionales típicos N-H, C-N Y N=C=O de la molécula de FITC, a 2200 cm⁻¹, estos confirmaron la funcionalización de los NTC con FITC. Finalmente, también pudimos constatar que al someter a los NTC A, B Y C se modificaron sus características estructurales, donde identificamos mediante SEM que con la oxidación y funcionalización de los NTC sufrieron cambios en su forma, se redujo el tamaño de las NPs, incrementó su porosidad, se modificó el color y aumento la aglomeración (**figuras 7-9**).

Al evaluar los efectos de los NTC A, B, y C sobre el desarrollo vegetal, los hallazgos que obtuvimos muestran que, a nivel de germinación de *Avena sativa*, existen diferencias dependientes de si el NTC se encuentran funcionalizado o no, se identificó en el caso del NTC-A que el tratamiento pristina tuvo mejores resultados en germinación, por el contrario en el nanotubo B y C fue los tratamiento funcionalizados los que alcanzaron mayor porcentaje de germinación, sin embargo, la mayoría de los tratamientos estimularon tanto la emergencia temprana como el porcentaje de germinación. Resultados similares han sido documentados en plantas de *Lycopersicum* y *Nicotiana tabacum* (Lahiani et al. 2015; Shweta et al. 2017), mientras que Joshi et al., año obtuvo que al exponer semillas de *Avena sativa* incrementó la velocidad de germinación con respecto al control, estos autores sugieren que estos efectos pueden atribuirse a las diferentes propiedades de los NTC, creando nuevos poros o funcionando como acuaporinas o aumentando la división celular, en el estudio realizado por Hadmi et al (2015) se demostraron diferencias en la germinación entre nanotubos funcionalizados con aminoácidos y los que no tenían estas moléculas⁴⁴. En otros estadios del desarrollo de avena, también observamos que las plántulas de *Avena sativa* se vieron afectado por los diferentes NTC, donde con la adición del nanotubo A pristina se obtuvieron resultados positivos en las 4 concentraciones (2.5, 5, 10 y 20 µg/mL), con diferencias evidentes en la altura de las plántulas, pero sobre todo en la arquitectura radical. Mientras que con la adición de NTC-A-oxidados se obtuvo un mayor desarrollo radical en las primeras concentraciones (2.5, 5 y 10 µg/mL) pero al llegar a la concentración de 20 µg/mL se vio un decaimiento en la longitud de la raíz, así como una inhibición de raíces laterales (**figura 10**). En el caso del nanotubo B se obtuvo resultados similares, en NTC-B-pristina se observó un crecimiento en la estructura radical al aumentar su concentración, mientras que en NTC-B-oxidado a partir de 10 µg/mL empezó a verse efectos negativos tanto con la adición de nanotubos oxidados o funcionalizados (**figura 11**). Por último, con la adición del nanotubo correspondiente al NTC de origen natural, observamos en el caso del tratamiento pristina se observa un aumento en la estructura radical hasta la concentración de 10 µg/mL esto vuelve a suceder en el tratamiento con NTC oxidados mientras que con el NTC funcionalizado se muestra un aumento creciente en la estructura radical (**figura 12**). Estos cambios en la estructura radical les da a las plántulas desde una mayor absorción de agua y

nutrientes hasta un establecimiento más estable (Cuadros, et al, 2011). Existen numerosos estudios que muestran efectos contrastantes con la interacción de los NTC sintéticos pristina con plantas, donde se han documentado efectos tanto positivos como negativos (Martínez et al., 2016; Tiwari et al., 2014; Joshi et al., 2018), sin embargo, los efectos de los NTC naturales ha sido poco documentado, algunos resultados sugieren que los nanotubos naturales vs sintéticos suelen tener efectos distintos en el desarrollo vegetal (Juárez et al., 2020). Algunos de los efectos positivos de los SWCNT sintéticos reportados en la germinación y el crecimiento de las plantas, esto varía según las concentraciones y los tipos de plantas, algunas semillas tratadas con NTC y que se obtuvieron resultados positivos son *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Avena sativa*, *Cynodon dactylon*, *Solanum*. Por otro lado, efectos negativos se han documentado en *copersicon esculentum*, *Allium cepa* y *Cucumis sativus* ¹⁹. Los efectos positivos y negativos se han atribuido a las propiedades físico-químicas de los NTC, mismas que con el proceso de oxidación de los nanotubos de carbono cambian, sobre todo la reactividad (Andrade et al. 2012), esto puede influir al momento de tener contacto con la planta. En general, los resultados que obtuvimos mostraron que los NTC influenciaron tanto la longitud de la raíz principal, como la formación de raíces laterales, lo que se ve reflejado en parámetros como el volumen y área radical. Aunado a esto, también pudimos observar que dichos efectos son distintos dependiendo de la funcionalización de los NTC, siendo en el caso del nanotubo A los tratamientos oxidados obtuvieron mejores resultados en la estructura radical, por su parte en los tratamientos C y B encontramos mejores resultados con la funcionalización de los NTC. Los efectos de estos nanomateriales en la raíz son de gran relevancia, ya que un sistema radical extenso confiere beneficios para un mejor establecimiento vegetal, mayor disponibilidad de recursos disponibles como el agua y minerales, así como la mejor absorción y aprovechamiento de estos (Joshi, et al., 2018). Por otro lado, también pudimos identificar que los efectos de los NTC fueron distintos al oxidar los NTC y funcionalizarlos, esto era de esperarse, ya que la oxidación de NTC les confiere una mayor solubilidad que los hace de más fácil interacción con los sistemas biológicos, aumentando su absorción y la facilidad de interaccionar con otros componentes minerales y estructurales en la planta. Lo que puede interferir en el comportamiento típico de la planta. Algunos autores han mostrado efectos similares como Kramer et al (2004) que identificaron una menor bioacumulación de los NTC al ser funcionalizados con un grupo amino por su parte cañas et al en (2008) realizaron un estudio en distintas plantas (*Zea mays*, *Daucus carota*, *Allium cepa*, *Solanum lycopersicum* y *Cucumis sativus*) donde les agregaba NTC sin funcionalizar y funcionalizados sus hallazgos mostraron que los NTC funcionalizados actuaban de mejor manera y en una mayor cantidad de estas plantas, estos autores sugieren que al modificar la estructura del NTC con la una molécula, le estamos confiriendo características que estimulan los diferentes procesos por los cuales el NTC regulan el desarrollo vegetal.

Por otro lado, el uso de NTC también se ha explorado en procesos bioquímicos de las plantas, por ejemplo, en la fotosíntesis, debido a que es uno de los procesos nutricionales esenciales y que converge en otros procesos críticos del desarrollo vegetal. Por ejemplo, Giraldo et al. 2016 demostraron que los nanotubos pueden atravesar las membranas y aumentar el desempeño fotosintético, lo que se puede traducir en plantas de mayor biomasa y rendimiento. Por lo que con el objetivo de evaluar los efectos de los NTC A, B y C pristina, oxidados y funcionalizados, al medir la tasa fotosintética analizamos 3 parámetros; Phi2 que es el porcentaje de luz que entra al fotosistema por su parte phiNO nos da la proporción de luz que entra y sale de la planta, la planta regula la luz para así disminuir daños y por ultimo phiPQ nos indica la luz que se pierde por procesos no regulados⁴⁵. Los resultados que encontramos mostraron que phiNO y phiPQ no mostraron diferencias significativas en las plantas en estas condiciones experimentales analizadas, lo que nos indica que aun que este entrando mayor luz al fotosistema 2 no se ve afectada de manera negativa sin embargo, pudimos identificar diferencias significativas en Phi2 con la adición de NTC-C comparado al de las plantas control, mientras que con los NTC-A solo el tratamiento de 5 µg/mL funcionalizado y por su parte NTC-B el tratamiento que estuvo por encima fue 2.5 oxidado, al momento de diferenciar entre los nanotubos pristina, oxidados y funcionalizados no se puede sacar una diferencia significativa debido al parecido de los resultados. Por otro lado, se han documentado efectos positivos y negativos de los NTC en la biomasa de diversas especies vegetales Martínez et al., 2016 encontraron que al agregar NTC a concentraciones altas el peso fresco y seco disminuyeron en cambio a una concentración de 10 µg/mL aumentaron significativamente con respecto al control, dichos efectos se han asociados a una mayor estimulación de proteínas como CYCB, clave en procesos e división celular. Del mismo modo nosotros observamos un aumento significativo en el peso fresco y seco, siendo en la nanopartícula A donde todos los tratamientos estuvieron resultados por encima del control por su parte los nanotubos B y C tuvieron los tratamientos funcionalizados y oxidados con mejores resultados con respecto al control. Por otro lado, al evaluar la traslocación de NTC en la raíz de avena y cuantificación de fluorescencia, se mostró una clara diferencia entre las nanopartículas sin FITC y las que si tenían, estas últimas mostraron aglomeraciones de fluorescencia en puntos específicos, esto sucedió en la mayoría de las concentraciones, esto nos indica que la planta absorbió correctamente los nanotubos de carbono y estos se alojaron en la raíz, hay estudios que afirman esto mismo que nosotros, joshi et al. (2018) demostraron la traslocación de nanopartículas a través de los tejidos de la planta por diferentes técnicas microscópicas.

8. Conclusiones

La oxidación y posterior funcionalización de los nanotubos de carbono cambian su estructura molecular sus propiedades fisicoquímicas y colateralmente su efecto en Avena sativa, esto fue identificado al comparar los efectos entre NTC oxidados, funcionalizados y sin ningún tratamiento. Por otro lado, nuestros hallazgos demostraron la capacidad de los nanotubos de carbono para modificar el crecimiento y desarrollo de Avena sativa, promoviendo la germinación y el crecimiento tanto de la parte aérea como de la arquitectura radical, a su vez, observamos un aumento en la tasa fotosintética, incrementado la luz inducida en el fotosistema II, estos resultados se vieron favorecidos con la aplicación de los nanotubos de carbono a funcionalizados, por lo cual, podemos concluir que estos procesos hacen que las nanopartículas modificadas afecten de mejor manera a Avena sativa, por su parte no existió diferencia significativa entre los NTC sintéticos y naturales. Se demostró que las NTC logran ser absorbidas y traslocadas por la raíz, pero se requieren más estudios donde se observe la traslocación en otras partes de la planta, para así conocer un poco más los efectos que tienen estos sobre los sistemas vegetales.

9. Referencias

1. Wang, Y., Sun, S., Zhang, Z. & Shi, D. Nanomaterials for Cancer Precision Medicine. *Adv. Mater.* **30**, 1–21 (2018).
2. Damodharan, J. Nanomaterials in medicine - An overview. *Mater. Today Proc.* **37**, 383–385 (2020).
3. Siddiqui, M. H., Firoz, M. H. A. & Impact, T. *Nanotechnology and Plant Sciences*. *Nanotechnology and Plant Sciences* (2015). doi:10.1007/978-3-319-14502-0.
4. Ali, S., Mehmood, A. & Khan, N. Uptake, Translocation, and Consequences of Nanomaterials on Plant Growth and Stress Adaptation. *J. Nanomater.* **2021**, (2021).
5. Mclamore, E. S. *et al.* Non-invasive quantification of endogenous root auxin transport using an integrated flux microsensor technique. 1004–1016 (2010) doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04300.x.
6. Marlene Lariza Andrade Cuel, Lluvia Itzel López López, A. S. C. Carbon nanotubes: Functionalization and biological applications. *Int. J. Pharm. Res.* **12**, 9–18 (2020).
7. Domingo, C. & Santoro, G. Espectroscopía Raman de nanotubos de carbono. *Opt. Pura y Apl.* **40**, 175–186 (2007).
8. Sala, O. Capítulo 1: Fundamentos de espectroscopía Raman. *Fundam. da espectroscopía Raman e no infravermelho* 10–34 (1996).
9. Piqué, T. M. & Vázquez, A. Concreto y cemento: Investigación y desarrollo. *Concreto y Cem. Investig. y Desarro.* **3**, 62–71 (2012).
10. Alcca Quispe, F. Síntesis de los Nanotubos de Carbono. *Tesis Digit. UNMSM* 8 (2015).
11. Dang, S. S. & Chen, X. W. Natural lavas as catalysts for efficient production of carbon nanotubes and nanofibers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 1823–1824 (2007).
12. Lara-Romero, J. *et al.* Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. *PeerJ* **2017**, 1–15 (2017).
13. Lira-Saldivar, R. H., Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I. & De Los Santos-Villarreal, G. Potencial de la Nanotecnología Para el Desarrollo de la Agricultura Sustentable. *2º Taller Agronanotecnología* 20–41 (2016).
14. Joshi, A. *et al.* Tracking multi-walled carbon nanotubes inside oat (*Avena sativa* L.) plants and assessing their effect on growth, yield, and mammalian (human) cell viability. *Appl. Nanosci.* **8**, 1399–1414 (2018).
15. Wang, X. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *J. Nanoparticle Res.* **14**, (2012).
16. Martínez-Ballesta, M. C., Zapata, L., Chalbi, N. & Carvajal, M. Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *J. Nanobiotechnology* **14**, 1–14 (2016).
17. Velikova, V. *et al.* Single-walled carbon nanotubes modify leaf micromorphology, chloroplast ultrastructure and photosynthetic activity of pea plants. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).

18. Chalbi, N., Martínez-Ballesta, M. C., Youssef, N. Ben & Carvajal, M. Intrinsic stability of Brassicaceae plasma membrane in relation to changes in proteins and lipids as a response to salinity. *J. Plant Physiol.* **175**, 148–156 (2015).
19. Zhu, H., Han, J., Xiao, J. Q. & Jin, Y. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J. Environ. Monit.* **10**, 713–717 (2008).
20. Hossain, Z., Mustafa, G. & Komatsu, S. Plant responses to nanoparticle stress. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 26644–26653 (2015).
21. McGehee, D. L., Lahiani, M. H., Irin, F., Green, M. J. & Khodakovskaya, M. V. Multiwalled Carbon Nanotubes Dramatically Affect the Fruit Metabolome of Exposed Tomato Plants. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 32430–32435 (2017).
22. Introduction, A. 19 . Exchange of Solutes between Phloem and Xylem and Circulation in the Whole Plant B . Structural Considerations Relating to Phloem-Xylem Exchange. (1975).
23. Pérez-de-Luque, A. Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture? *Front. Environ. Sci.* **5**, 1–7 (2017).
24. Etxeberria, E., Gonzalez, P., Baroja-Fernandez, E. & Pozueta Romero, J. Fluid phase endocytic uptake of artificial nano-spheres and fluorescent quantum dots by sycamore cultured cells: Evidence for the distribution of solutes to different intracellular compartments. *Plant Signal. Behav.* **1**, 196–200 (2006).
25. Tripathi, D. K. *et al.* Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **110**, 70–81 (2017).
26. Zhu, Z. J. *et al.* Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 12391–12398 (2012).
27. Serag, M. F. *et al.* Trafficking and Subcellular Localization. *ACS Nano* **XXX**, 493–499 (2010).
28. Roberts, A. G. & Oparka, K. J. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell Environ.* **26**, 103–124 (2003).
29. Buick, R. D., Buchan, G. D. & Field, R. J. The role of surface tension of spreading droplets in absorption of a herbicide formulation via leaf stomata. *Pestic. Sci.* **38**, 227–235 (1993).
30. Wong, M. H. *et al.* Lipid Exchange Envelope Penetration (LEEP) of Nanoparticles for Plant Engineering: A Universal Localization Mechanism. *Nano Lett.* **16**, 1161–1172 (2016).
31. Nel, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **8**, 543–557 (2009).
32. Schwab, F. *et al.* Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review. *Nanotoxicology* **10**, 257–278 (2016).
33. Manuel de Jesus Cazares Preciado. Universidad Autonoma Agraria. 1–114 (1999).
34. Pérez-Urria Carril, E. Fotosíntesis: Aspectos Básicos. *Reduca (Biología)* **2**, 1–47 (2009).
35. Paula, A., Flores, H., Paula, A. & Flores, H. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada , Baja California Programa de posgrado en ciencias División Ciencias de la Tierra Presenta. (2015).
36. Labarthe, F. & Pelta, H. Introducción básica a la fotosíntesis y características de especies forrajeras megatérmicas Estación Experimental Agropecuaria Bordenave. *Estac. Exp. Agropecu. Bordenave* 1–10 (2009).

37. Giraldo, J. P. *et al.* Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing. *Nat. Mater.* **13**, 400–408 (2014).
38. Ghasemi-Kooch, M. & Dehestani, M. Interaction of photosynthetic pigments with single-walled carbon nanotube (15, 15): a molecular dynamics study. *Adsorption* **24**, 43–51 (2018).
39. Dorogi, M. *et al.* Stabilization effect of single-walled carbon nanotubes on the functioning of photosynthetic reaction centers. *J. Phys. Chem. B* **110**, 21473–21479 (2006).
40. Boutouyrie-Dumont, B. Research Highlights. *Biomark. Med.* **8**, 73–75 (2014).
41. Swift, T. A., Oliver, T. A. A., Carmen Galan, M. & Whitney, H. M. Functional nanomaterials to augment photosynthesis: Evidence and considerations for their responsible use in agricultural applications. *Interface Focus* **9**, (2019).
42. Jenks, M. A., Eigenbrode, S. D. & Lemieux, B. Cuticular Waxes of Arabidopsis. *Arab. B.* **1**, e0016 (2002).
43. Riog, X. Grupos funcionales: Orígenes. *Asoc. Ibérica Mirmecología Blog xauxa*. 5 (2010).
44. Hamdi, H., De La Torre-Roche, R., Hawthorne, J. & White, J. C. Impact of non-functionalized and amino-functionalized multiwall carbon nanotubes on pesticide uptake by lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Nanotoxicology* **9**, 172–180 (2015).
45. Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O. & Edwards, G. E. New uorescence parameters for the determination of Q. *Biol. Chem.* 209–218 (2004).