

FITOTOXICIDAD POR NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPAREDES Y NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE GRAFITO EN PLANTAS DE *Raphanus Sativus*

Data de aceite: 02/06/2023

R.H. Lira-Saldivar

Departamento de Biociencias y Agrotecnología, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)

B. Méndez-Argüello

Departamento de Biociencias y Agrotecnología, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)

I. Vera-Reyes

Departamento de Biociencias y Agrotecnología, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)

G. De los Santos-Villarreal

Departamento de Química Macromolecular y Nanomateriales. Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coahuila, México

RESUMEN. Este trabajo consistió en la realización de dos bioensayos en los que se utilizaron nanotubos de carbono multiparedes (NTCM) y nanopartículas de óxido de grafito (NPsOG). En el primero se imbibieron las semillas de *R. sativus* durante 2 h en soluciones conteniendo NTCM y NPsOG en concentraciones 0, 100 y 200 ppm. En el segundo bioensayo

en invernadero, se sembraron semillas de rábano en contenedores conteniendo un sustrato mezclado de zeolita y turba. Cuando las plantas tuvieron un par de hojas verdaderas se iniciaron las aplicaciones foliares cada semana con las concentraciones antes señaladas. Los resultados revelaron que en ambos bioensayos los NTCM y las NPsOG, afectaron negativamente la germinación de semillas y provocaron menor altura, área foliar y biomasa de las plantas, indicando esto un efecto fitotóxico.

PALABRAS CLAVE: Agronotecnología, nanomateriales de carbono, zeolita, fitotoxicidad.

ABSTRACT. This work consisted in the establishment of two bioassays in which multiwall carbon nanotubes (NTCM) and graphite oxide nanoparticles (NPsOG) were investigated. The seeds of *R. sativus* were soaked for 2 h in solutions containing NTCM and NPsOG at concentrations of 0, 100 and 200 ppm. In the second bioassay under greenhouse conditions, radish seeds were sown in containers containing a mixture of zeolite and peat moss. When the plants had a pair of true leaves, foliar applications every week with the concentrations

aforementioned began. The results revealed that in both bioassays the NTCM and NPsOG, adversely affected seed germination and caused lower height, leaf area and plant biomass, indicating these results a phytotoxic effect.

KEYWORDS: Agronanotechnology, carbon nanomaterials, zeolite, phytotoxicity.

1 | INTRODUCCIÓN

Los avances en nanotecnología (NT) se están integrando en la biología y ha llevado al surgimiento de nuevas disciplinas como la nanobiotecnología, en la cual las NPs tienen interesantes aplicaciones. Las NPs son agregados atómicos o moleculares con una dimensión entre 1 y 100 nm [1], con propiedades físico-químicas diferentes en comparación con el material de tamaño micrométrico [2,3]. Las aplicaciones de la NT en la agricultura moderna tienen gran impacto a través del desarrollo de NPs metálicas y derivadas del carbono que prometen mejorar la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas[4], producir nanofertilizantes con liberación controlada de nutrientes [5], nanocápsulas para la aplicación controlada de herbicidas [6], lo que es posible que las nanoformulaciones permitan reducir la dosis y frecuencia de aplicación en comparación con las formulaciones convencionales [7].

Los nanomateriales derivados del carbono, como los NTCM y NPsOG, son ampliamente usados en ciencias biológicas y de materiales. Por su tamaño nanométrico tienen la facilidad de penetran en las células, pueden activar los canales de agua y facilitar el transporte de nutrientes, mejorando la germinación y crecimiento de las plantas. Sin embargo, no se conoce las cantidades óptimas de aplicación, diversos investigadores mencionan que altas concentraciones pueden causar daño potencial a las membranas celulares; alterar el balance de nutrientes y pérdida de electrolitos, provocando menor crecimiento vegetativo [8].

Su aplicación en plantas de interés agrícola puede generar efectos fitotóxicos, ya que causan un desbalance del contenido de nutrientes y reducción de la actividad fotosintética, limitando el crecimiento de las plantas [9]. Con el fin de entender los posibles beneficios de la aplicación de la NT a la agricultura, se debe estudiar el efecto de la aplicación de NPs en semillas y en plantas, debido a que existe información no concluyente y un problema es su potencial fitotoxicidad a determinadas concentraciones.

De manera similar algunos materiales como las zeolitas, se están utilizado para mejorar la retención de agua, como acarreadores de nutrientes; y para la recuperación de suelos contaminados por fertilizantes, herbicidas y pesticidas. Estos materiales aluminosilicatos promueven la germinación de semillas, crecimiento de las plantas, fijación del fósforo y nitrógeno [10]. Las zeolitas son minerales de origen volcánico con una estructura cristalina tridimensional formada con poros y canales, que pueden ser utilizadas para eficientar el uso de fertilizantes [11]. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue

investigar mediante dos bioensayos realizados en condiciones de laboratorio e invernadero, el efecto de NTCM y NPsOG en la germinación de semillas y en el crecimiento de plantas de *R. sativus*.

2 I METODOLOGIA

Se realizaron dos experimentos: el primero consistió en imbibición de semillas de rábano con NPsOG y NTCM (0, 100 y 200 ppm); el segundo fue con aplicaciones foliares semanales de las mismas NPs. Se realizó en condiciones de agricultura protegida en un invernadero de tecnología media en el campo experimental del CIQA, en Saltillo, Coahuila.

2.1 Nanopartículas utilizadas y caracterización por microscopía TEM y Raman

Se evaluaron NTCM comerciales de 30-50 nm y 90% de pureza, adquiridos con la empresa NanoAmor Inc. New Mexico, USA. Las NPsOG fueron sintetizadas en CIQA y caracterizadas por las técnicas TEM y espectroscopía Raman. Como controles absolutos se utilizaron carbón mineral y grafito en tamaño micrométrico de origen natural de minas de la región y proporcionados por el Departamento de Síntesis de Polímeros.

2.2 Preparación de las soluciones con NPs

Las soluciones con los NTCM, NPsOG, micropartículas de carbón mineral y grafito fueron preparadas en concentraciones de 0, 100 y 200 mg L⁻¹ en agua destilada y dispersadas con un sonicador Branson 2510, por 30 minutos.

2.3 Manejo del cultivo

Etapa de germinación. La siembra de las semillas de *Raphanus sativus* cv Champion (Fax de Occidente S.A. DE C.V.) fue en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato de peat moss. Antes de la siembra, las semillas se trataron con las soluciones conteniendo NPs, se dejaron imbibir durante 2 h para esta etapa se establecieron 5 tratamientos con 20 repeticiones cada uno. El tiempo de evaluación fue de 20 días.

Etapa de plántulas. Se prepararon dos mezclas diferentes de sustrato (70% peat moss + 30% perlita y 70% peat moss + 30% zeolita). La siembra se realizó en macetas de polietileno de 5 L de capacidad. Durante el desarrollo del cultivo se aplicó riego de acuerdo a la demanda hídrica de la planta y cada tercer día se fertilizó con una solución Hoagland, la duración del experimento fue de 45 días.

2.4 Aplicación de NPs a las plantas

La aplicación foliar de las NPs fue manual una vez por semana, tres aplicaciones en todo el periodo experimental, con aspersores de 20 mL de capacidad, se aplicó 1mL de las diferentes soluciones de NPs y el control absoluto fue agua destilada en la misma cantidad. Como controles se aplicaron las micropartículas de grafito y carbón mineral en las mismas

concentraciones. Al momento de la aplicación se agregó un adherente comercial, este producto es utilizado en agricultura que para facilitar la adherencia de cualquier producto químico en las hojas beneficiando la absorción.

2.5 Determinación del crecimiento y biomasa

Se midió altura de la planta, área foliar (LI-COR modelo LI-300, Lincoln, Nebraska, USA), número de hojas, índice de clorofila (Minolta SPAD 502), longitud de raíz, tamaño del bulbo (diámetro longitudinal y ecuatorial) y biomasa seca (hojas, tallo, raíz). Estas mediciones se hicieron al final del experimento en todas las plantas.

2.6 Análisis estadístico de datos

El diseño experimental empleado fue completamente al azar con cinco tratamientos y 20 repeticiones en el bioensayo 1 (etapa de germinación) los tratamientos se diseñaron de acuerdo a la concentración (ppm) de los nanomateriales (NPsOG ó NTCM), como se muestra a continuación:

T1= Control	T1= Control
T2= Grafito (100)	T2= Carbon mineral (100)
T3= Grafito (200)	T3= Carbon mineral (200)
T4= NPsOG (100)	T4= NTCM (100)
T5= NPsOG (200)	T5= NTCM (200)

En el bioensayo 2 se evaluaron seis tratamientos con cinco repeticiones en diseño factorial AxB. En donde el factor A fue el sustrato (Peat moss: perlita y peat moss: zeolita, 70:30 v/v); el factor B consistió en las concentraciones de NPsOG y NTCM según correspondiera (0, 100 y 200 ppm).

Cada maceta con 4 plantas fue una repetición. La distribución se presenta en la Tabla 1. La valoración de las variables fisiológicas se realizó mediante un análisis de varianza y prueba de rango múltiple Tukey ($p \leq 0.05$), con el software estadístico SAS-JMP versión 5.0.1 (SAS Institute, 2002).

Nanopartículas (ppm)	Sustratos	
	70:30 pm: p (v/v)	70:30 pm: z (v/v)
0	T1	T2
100	T3	T4
200	T5	T6

Ppm= partes por millón, v/v= proporciones mezcladas en base a volumen/volumen, pm= peat moss, p= perlita, Z= zeolita, T= tratamiento.

Tabla 1. Distribución de tratamientos del segundo bioensayo en el cual se aplicaron NPsOG y NTCM foliarmente.

3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización microscópica de las nanopartículas de óxido de grafeno

En la Figura 1 se observa el espectro Raman, la cual es una técnica que permite estudiar los modos vibratorios y rotatorios de baja frecuencia dando lugar a bandas o señales que permiten medir el grado de hibridación molecular (orden o desorden) y predecir con ello algunas de sus propiedades. En este espectro en particular, se logra apreciar la banda D en 1200 cm^{-1} prácticamente con la misma intensidad que la banda G en aproximadamente 1600 cm^{-1} , lo que indica que la cantidad de átomos de carbono de hibridación sp^2 y sp^3 en la muestra es similar deduciendo la existencia de defectos que conllevan al desorden atómico en la estructura. La ausencia de la banda M indica que el material no es conductor.

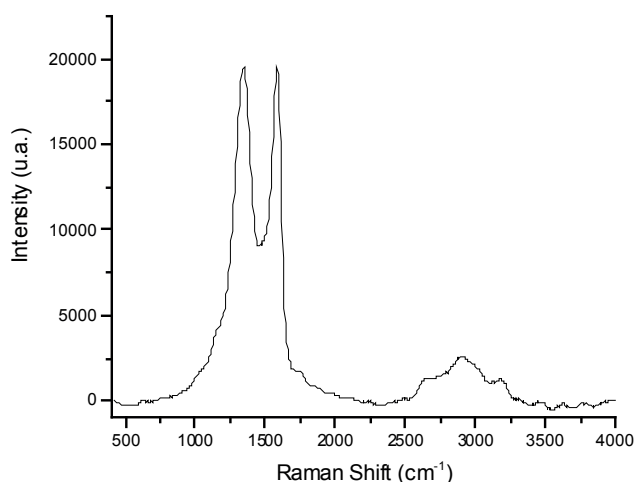


Figura 1. Espectroscopía Raman de nanopartículas de óxido de grafito

En la Figura 2 se presenta la imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión, técnica que utiliza la potencia amplificadora de un haz de electrones para visualizar la imagen de un material. La imagen se construye observando la trayectoria de los electrones que lograron atravesar una muestra de muy bajo espesor. En esta imagen se observan láminas de grafeno con algunas micras de tamaño depositadas sobre una rejilla de carbono las cuales se encuentran empalmadas unas con otras.

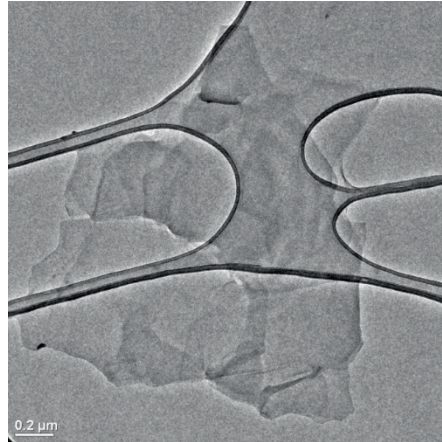


Figura 2. Imagen de microscopía TEM de las nanopartículas de óxido de grafito utilizadas.

3.2 Imbibición con NTCM y NPsOG y su efecto en la germinación de semillas rábano

La imbibición de las semillas de rábano con NPsOG durante 2 h antes de la siembra, provocó significativamente fitotoxicidad ($p \leq 0.05$) (Figura 3A); con 100 ppm (T4), la altura fue afectada en 23.73% (Figura 4A), número de hojas (19.15%, Figura 4B), diámetro de tallo (12.81%), biomasa fresca (54.47%, 4C) y biomasa seca (41.18%, Figura 4D) respecto al control (T1). Tanto el grafito en tamaño micrométrico como las NPs de óxido de grafito provocaron fitotoxicidad, pero se puede apreciar que las NPs a partir de 100 ppm causaron significativamente mayor daño en las plantas.

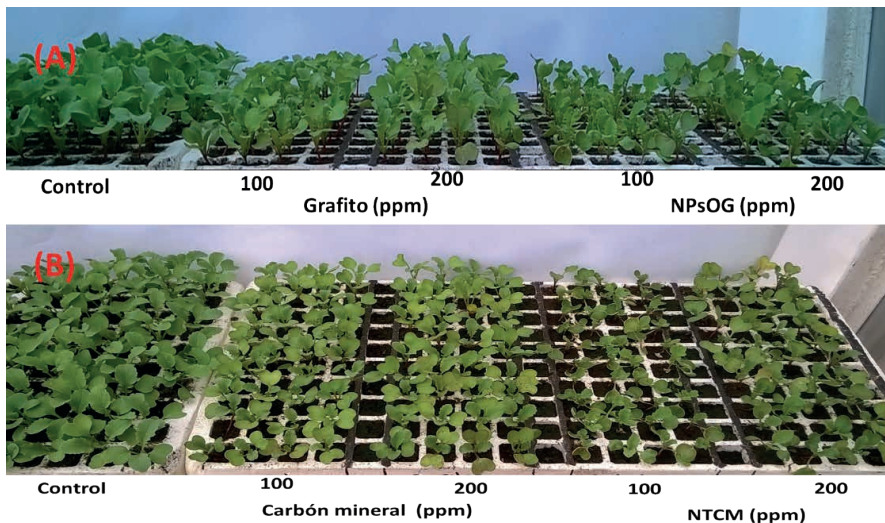


Figura 3. Efecto en el crecimiento de las plantas de rábano. (A) Imbibición de las semillas con micropartículas de grafito y NPsOG; (B) imbibición de las semillas con carbón mineral y NTCM.

La imbibición de las semillas de rábano con NTCM por 2 h antes de la siembra influyó en la fisiología de las plantas (Figura 3B), observándose que la concentración de 200 ppm (T5) causó significativamente fitotoxicidad ($p \leq 0.05$). La altura de la planta en el T5 fue menor (15.41%, Figura 5A), biomasa fresca (27.68%, Figura 5B), la longitud de la raíz también fue afectada (13.57%, Figura 5C) y la biomasa seca se redujo en 41.18% (Figura 5D) en comparación con el tratamiento control (T1).

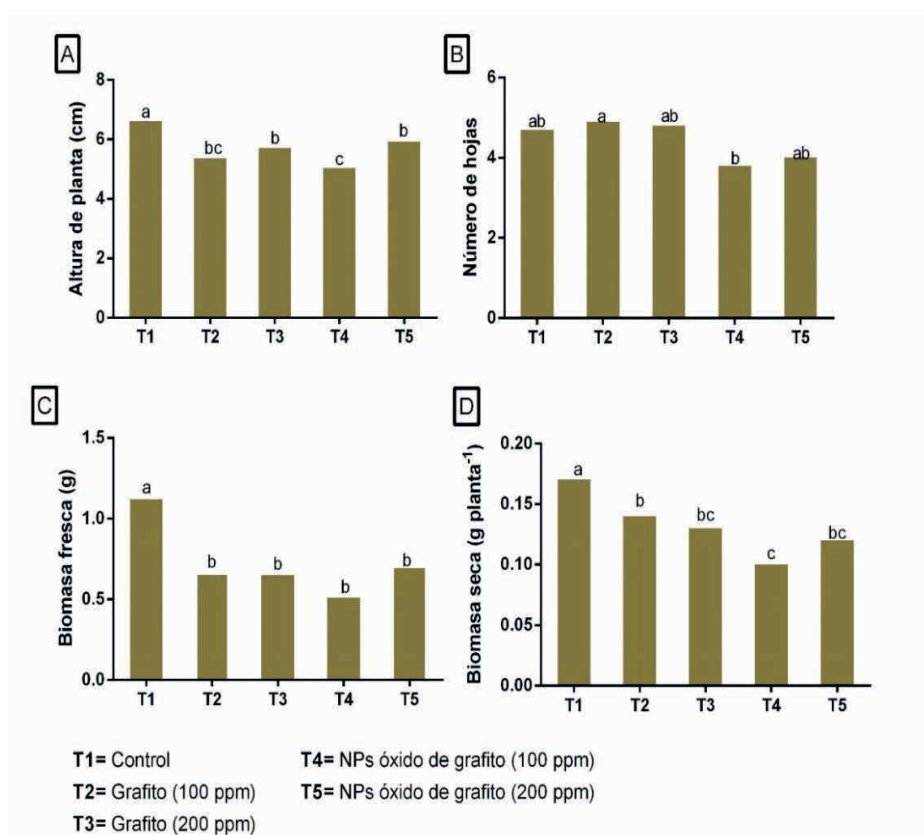


Figura 4. Imbibición de semillas de rábano con NPSOG y su repuesta en el crecimiento. (A) altura de planta, (B) número de hojas, (C) biomasa fresca y (D) biomasa seca. Letras diferentes en barras indica significancia estadística ($p \leq 0.05$).

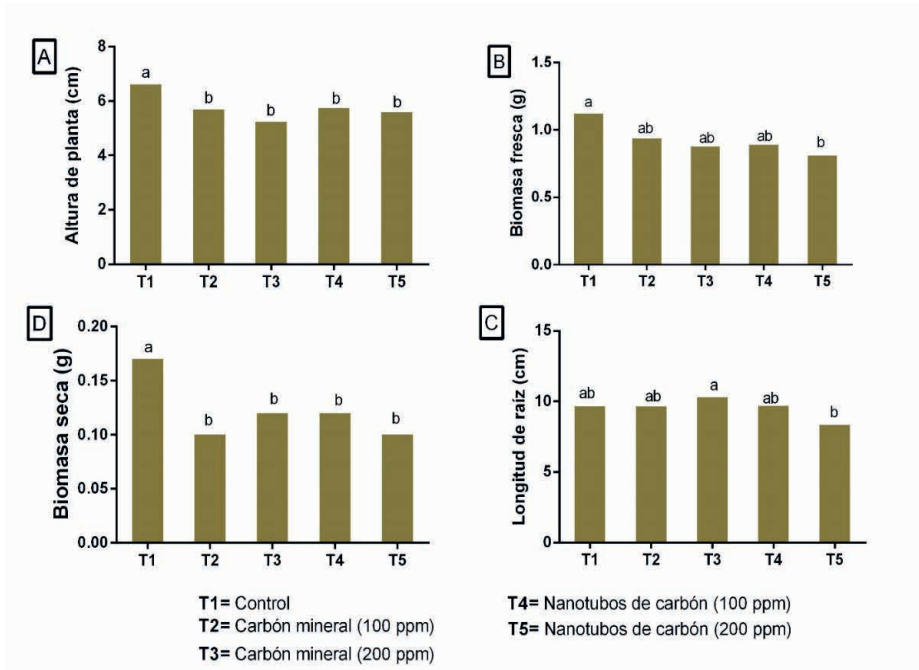


Figura 5. Imbibición de semillas de rábano con NTCM y su repuesta en el crecimiento de plantas de *Raphanus sativus*. (A) altura de planta, (B) número de hojas, (C) biomasa fresca y (D) biomasa seca. Letras diferentes en barras indica significancia estadística ($p \leq 0.05$).

3.3 Crecimiento de plántulas en invernadero

En la Tabla 2 se presentan los valores promedio de todas las repeticiones de los sustratos con zeolita (Factor A), la aplicación foliar de NPsOG (Factor B) y la interacción de ambos factores (A x B). El sustrato que contenía zeolita, promovió el crecimiento de las plantas expresándose en mayor área foliar (7%) y tamaño de bulbo (14.25%), en comparación con las plantas que fueron cultivadas con peat moss: perlita (70:30 v/v).

Tratamientos	Área foliar (cm ²)	Peso seco bulbo (g)	Biomasa seca (g)	Número de hojas	Índice clorofila (U Spad)
Sustratos					
70:30 (PM:P)	365.13 a	0.69 a	1.28 a	9.20 a	36.37 a
70:30 (PM:Z)	408.83 a	0.71 a	1.37 a	8.93 a	34.43 a
p ≤ 0.05	0.257	0.836	0.572	0.385	0.332
NTCM (ppm)					
0	386.01 a	0.88 a	1.33 a	9.20 a	34.30 a
100	381.83 a	0.58 a	1.28 a	9.20 a	37.42 a
200	393.10 a	0.63 a	1.37 a	8.80 a	34.49 a
p ≤ 0.05	0.969	0.157	0.879	0.469	0.362
Interacción					
0 + PM:P	441.93 a	1.14 a	1.54 a	9.60 a	35.14 a
0 +PM:Z	330.09 a	0.63 ab	1.12 a	8.80 a	33.46 a
100+PM:P	321.69 a	0.39 b	1.13 a	9.40 a	40.44 a
100+PM:Z	441.96 a	0.78 ab	1.43 a	9.00 a	34.40 a
200+PM:P	331.77 a	0.53 ab	1.18 a	8.60 a	33.54 a
200+PM:Z	454.43 a	0.73 ab	1.56 a	9.00 a	35.44 a
p ≤ 0.05	0.025	0.022*	0.058	0.274	0.273

Valores con la misma literal en columnas no son significativos estadísticamente ($P \leq 0.05$). PM= peat moss, P = perlita, Z= zeolita, NTCM= nanotubos de carbono multiparedes. (70:30 indican las cantidades mezcladas en base a volumen-volumen).

Tabla 2. Producción de biomasa de plantas *Raphanus sativus* con la aplicación foliar de nanopartículas de óxido de grafito.

Por otra parte, las plantas que se aplicaron foliarmente 100 ppm de NPsOG, se observó un efecto fitotóxico ($p \leq 0.05$), expresando en menor altura (6.94%), diámetro de bulbo (16.48%), tamaño del bulbo (15.67%), de la misma manera el área foliar fue menor (30.17%) en las plantas que se aplicó NPs de grafito, la biomasa seca del bulbo se redujo significativamente (51.73%) y la biomasa seca de la parte aérea fue menor (28.58%) respecto al control (0 ppm) (Figura 6).

Tratamientos	Área foliar (cm ²)	Biomasa (g)			Biomasa seca
		Peso fresco bulbo	Biomasa fresca	Peso seco bulbo	
Sustratos					
70:30 (PM:P)	332.74a	9.45b	16.86a	0.49b	1.08a
70:30 (PM:Z)	358.51a	13.92a	17.83a	0.78a	1.17a
p≤ 0.05	0.424	0.018**	0.590	0.004**	0.485
NPs OG (ppm)					
0	393.65a	17.17a	19.44a	0.87a	1.26a
100	274.89b	7.11b	13.73b	0.42b	0.90ab
200	368.34ab	10.79b	18.86ab	0.61ab	1.20b
p≤ 0.05	0.013**	0.0004**	0.028*	0.002**	0.050*
Interacción					
0 + PM:P	414.37a	15.68ab	20.78a	0.74 abc	1.36a
0 +PM:Z	372.93a	18.65a	18.09a	0.99a	1.16a
100+PM:P	245.30a	5.56c	12.07a	0.30c	0.77a
100+PM:Z	304.48a	8.67bc	15.38a	0.55abc	1.04a
200+PM:P	338.54a	7.13bc	17.71a	0.44bc	1.11a
200+PM:Z	398.13a	14.44abc	20.02a	0.79ab	1.29a
p≤ 0.05	0.342	0.001**	0.354	0.002**	0.257

Valores con la misma literal en columnas no son significativos estadísticamente (p≤ 0.05). PM= peat moss o turba, P = perlita, Z= zeolita (70:30 indican las cantidades mezcladas en base a volumen-volumen), OG= nanopartículas de óxido de grafito.

Tabla 3. Efecto en el crecimiento de plantas de *R. sativus* con la aplicación foliar de nanotubos de carbono.

En la Tabla 3 se presentan los valores promedio de todas las repeticiones de cada uno de los tratamientos. Para el factor A (sustratos conteniendo zeolita), para factor B aplicación foliar de NTCM y la interacción de ambos factores (A x B). Los resultados indican que las plantas cultivadas en sustratos conteniendo zeolita presentaron un crecimiento superior, observándose en mayor área foliar (11.96%) y biomasa seca del bulbo (2.89%), en comparación a las plantas cultivadas en sustratos sin este aluminosilicato.

El índice de clorofila y número de hojas no mostró ningún cambio en los diferentes sustratos de siembra. Contrariamente la aplicación foliar de 100 y 200 ppm de NTCM causó cuantitativamente fitotoxicidad en las plantas (Figura 7), expresándose en menor biomasa seca de bulbos (34 y 28.40% respectivamente). Los resultados de la interacción de sustrato con zeolita y nanopartículas no favoreció el crecimiento. Se observó menor crecimiento en las plantas cultivadas con sustrato contiendo zeolita y aplicación de NTCM.



Figura 6. Efecto de la aplicación foliar de NPsOG en el crecimiento de plantas de rábano. A) Control con aplicación foliar de agua destilada y B) aplicación foliar de NPsOG.

Los resultados de este trabajo indican que la imbibición de semillas con NPs derivadas del carbono antes de la siembra y la aplicación foliar después de la emergencia de las plántulas afecta negativamente el crecimiento. Aunque no existe una explicación clara sobre su efecto en la fisiología de la planta, diversos trabajos realizados en otras partes del mundo han demostrado que el uso de NPs derivadas del carbón tienen efecto fitotóxico cuando se aplican concentraciones elevadas ($100-1500 \text{ mg L}^{-1}$), los autores señalan que pueden estar asociados con la inducción de estrés oxidativo que generan los nanomateriales y que conjuntamente causan un desbalance del contenido de nutrientes y la reducción de la actividad fotosintética, limitando el crecimiento de las plantas [9].

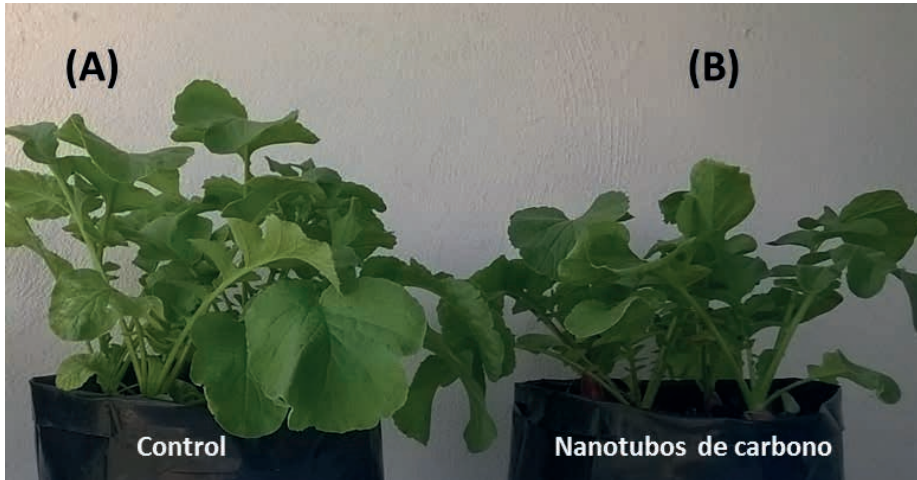


Figura 7. Efecto de la aplicación foliar de NTCM en el crecimiento de plantas de rábano. A) Control con aplicación foliar de agua destilada y B) aplicación foliar de NTCM.

Los pocos trabajos realizados con plantas no presentan resultados concluyentes, a si por ejemplo un estudio con semillas de lechuga, calabacita, tomate y espinaca a concentraciones de 2000 mg L^{-1} de NPs de grafeno provocaron fitotoxicidad de las plantas. Este estudio demostró que inducen un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando daño celular y lesiones necróticas por alta bioacumulación, concluyendo que el nivel de daño puede estar determinado por la dosis y tiempo de exposición; otros investigadores mencionan que generalmente dosis elevadas (2000 mg L^{-1}) provocan fuerte toxicidad [12] por cantidades elevadas de bioacumulación en los tejidos de las plantas, al respecto señalan que la aplicación de NPs generan una producción excesiva de ROS que tiene un efecto potencial en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos relacionados con el crecimiento; además, incrementan la actividad enzimática de la catalasa y peroxidasa; y alteran las concentraciones de ácido indolacético y absicico que están estrechamente relacionando con el crecimiento [13]. Ha sido señalado también que altas concentraciones de grafeno podrían provocar daño masivo de las membranas celulares e inducir una fuga exagerada de electrolitos, que pueden afectar el transporte de agua y solutos incrementándose el estrés oxidativo de las plantas y reflejando en una menor tasa de crecimiento [14].

Por otra parte, los nanomateriales gráfenicos a altas concentraciones ($50, 100$ y 200 mg L^{-1}) afectan negativamente el crecimiento de las plantas. La toxicidad podría ser un efecto del deterioro del crecimiento de las raíces, el incremento del estrés oxidativo, el desequilibrio de la homeostasis de los nutrientes y la inhibición de la fotosíntesis [9]. La alta producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) inducida por los nanomateriales derivados del carbón podría ser el responsable de la inhibición del crecimiento y la baja

producción de biomasa [12]. Las altas concentraciones y el tiempo de exposición de las NPs podrían ser dos factores importantes que inhiben el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas [15], además bioquímicamente alteran algunos procesos metabólicos, como alta acumulación de ácido absísico que afecta las concentraciones de ácido indolacético alterando negativamente el crecimiento de las plantas [16].

4 | CONCLUSIONES

La imbibición de las semillas con NTCM y NPsOG a concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹ antes de la siembra y su posterior aplicación foliar semanal durante 45 días, provocó fitotoxicidad. Estos resultados preliminares sugieren que estas NPs afectan el crecimiento y desarrollo del cultivo, sin embargo, se necesitan hacer más investigaciones referentes a este tema.

AGRADECIMIENTOS

El apoyo financiero para la realización de este trabajo fue proporcionado por el CIQA mediante el Proyecto número 6241. B. Méndez Argüello agradece al CONACYT por la beca número 230282 para su estancia posdoctoral.

REFERENCIAS

1. M.S. Mohamed y D.S. Kumar, (2016). Effect of nanoparticles on plants with regard to physiological attributes. In *Plant Nanotechnology*. Springer International Publishing, pp. 119-153.
2. A. Razzaq, R. Ammara, H.M. Jhazab, T. Mhamood, A. Hafeez y S. Hussain. (2016). A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. *Journal of Nanoscience and Technology*, V. 2, No.1, pp. 55–58.
3. S.D. Ebbs, S.J. Bradfield, P. Kumar, J.C. White, C. Musante y X. Ma. (2016). Accumulation of zinc, copper, or cerium in carrot (*Daucus carota*) exposed to metal oxide nanoparticles and metal ions. *Environmental Science: Nano*, V. 3, No. 1, pp. 114-126.
4. S.V. Raskar y S.L. Laware. (2014). Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, V. 3, No. 2, pp. 467-473.
5. M.R. Naderi y A. Danesh-Shahraki. (2013). Nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, V. 5, No. 19, pp. 2229-2232.
6. R. Grillo, P.C. Abhilash, y L.F. Fraceto. (2016). Nanotechnology applied to bio-encapsulation of pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, V. 16, No. 1, pp. 1231-1234.
7. M. Kah, A.K. Weniger y T. Hofmann. (2016). Impacts of (nano) formulations on the fate of an insecticide in soil and consequences for environmental exposure assessment. *Environmental Science and Technology*, V. 50, pp. 10960–10967.

8. A. Mondal, R. Basu, S. Das, y P. Nandy. (2011). Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect. *Journal of Nanoparticle Research*, V. 13, No. 10, pp. 4519-4528.
9. P. Zhang, R. Zhang, X. Fang, T. Song, X. Cai, H. Liu y S. Du. (2016). Toxic effects of graphene on the growth and nutritional levels of wheat (*Triticum aestivum* L.): short and long term exposure studies. *Journal of Hazardous Materials*, V. 317, pp. 543-551.
10. Rameshaiah, G.N. y JPallavi, S. (2015). Nano fertilizers and nano sensors—an attempt for developing smart agriculture. *International Journal of Engineering Research and General Science*, V. 3, No. 1, pp. 314-320.
11. A.C. De Campos Bernardi, J.C. Polidoro, M.B. de Melo Monte, E.I. Pereira, C.R. de Oliveira, y K. Ramesh. (2016). Enhancing Nutrient Use Efficiency Using Zeolites Minerals-A Review. *Advances in Chemical Engineering and Science*, V. 6, No. 4, pp. 295-304.
12. P. Begum, R. Ikhtiari, y B. Fugetsu. (2011). Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. *Carbon*, V. 49, No. 12, pp. 3907-3919.
13. F.Cheng, Y.F Liu, G.Y. Lu, X.K. Zhang, L.L. Xie, C.F. Yuan y B.B. Xu. (2016). Graphene oxide modulates root growth of *Brassica napus* L. and regulates ABA and IAA concentration. *Journal of Plant Physiology*, V. 193, pp. 57-63.
14. M.C. Martínez-Ballesta, L. Zapata, N. Chalbi y M. Carvajal. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *Journal of Nanobiotechnology*, V. 14, No. 1, pp. 1-10.
15. S. Liu, Wei, H., Li, Z., Li, S., Yan, H., He, Y. y Tian, Z. (2015). Effects of graphene on germination and seedling morphology in rice. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, V. 15, No.4, pp. 2695-2701.
16. J. Jiao, Cheng, F., Zhang, X., Xie, L., Li, Z., Yuan, C. y Zhang, L. (2016). Preparation of graphene oxide and its mechanism in promoting tomato roots growth. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, V. 16, No.4, pp. 4216-4223.