

POTENCIADOR DE FOTOSÍNTESIS A BASE DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE CARBONO, SU PROCESO DE OBTENCIÓN Y SU USO COMO NANOESTIMULANTES Y NANOESTIMULANTES EN CULTIVOS AGRÍCOLAS

CAMPO DE LA INVENCION

[001] La presente invención se encuentra en el campo de la agroquímica. Se trata de la elaboración de nanocompuestos a base de puntos de carbono, con propiedades luminiscentes y de transporte de nutrientes, que cuando se aplican vía foliar y/o radicular a la planta potencian la fotosíntesis, además de ser capaces de promover respuestas fisiológicas de mejora en el desarrollo y la productividad. Estas respuestas son típicas de los materiales clasificados en la literatura como bioestimulantes y/o biofertilizantes.

ESTADO DE LA TÉCNICA [002] El constante crecimiento de la población, concomitante con la urbanización galopante, ha presionado a la agricultura y a otros sectores productivos para que superen el reto de la creciente demanda de alimentos, la producción sostenible en zonas agrícolas limitadas, con una mano de obra rural decreciente y adaptada al cambio climático (JAGGARD; QI; OBER, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010).

[003] Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU), la población mundial superará los 9.000 millones de habitantes en 2050 y será necesario aumentar la producción de alimentos entre un 50 y un 70%. Paralelamente, la demanda por agua y energía crecerá proporcionalmente (KEATING *et al.*, *Global Food Security*, 3, 125-132, 2014).

[004] La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha mostrado su grave preocupación ante el

agotamiento y la degradación de los campos agrícolas, la drástica reducción de las fuentes de agua y sus efectos sobre la seguridad alimentaria y la preservación del ecosistema.(PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, *Frontiers in microbiology*, 8, 1014, 2017) . Por ejemplo, la demanda por cereales, tanto para alimentos como para piensos, puede alcanzar los 3.000 millones de toneladas en 2050, frente a los 2.100 millones actuales (KEATING et al. , *Global Food Security*, 3, 125-132, 2014) .

[005] Este escenario pesimista estimula un esfuerzo mundial para desarrollar formas alternativas de satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos, energía y agua, sin aumentar la presión sobre los recursos naturales (MUELLER et al., *Nature*, 490,254-257, Oct. 2012) .

[006] La agricultura es históricamente el sector más estable e importante que, a lo largo de varios siglos, se ha encargado de suministrar materias primas a las industrias de alimentos y piensos. Con la Revolución Verde de 1960, el suministro mundial de alimentos ha aumentado enormemente porque la agricultura se beneficia de una diversidad de innovaciones tecnológicas introducidas por los sectores de la biotecnología y la química. Sin embargo, la gran dependencia de los pesticidas y fertilizantes sintéticos tras la Revolución Verde ha provocado un impacto negativo en el ecosistema y la salud pública (EUROPEAN PUBLIC HEALTH ALLIANCE, *Agriculture and Public Health: Impacts and pathways for better coherence* 2016) .

[007] El uso abusivo de pesticidas y fertilizantes contribuye a la contaminación de los ecosistemas y a la eutrofización del medio acuático y de los suelos ('TILMAN et al.,*Nature*, 490, 254-257, 2002; BHAT, *Asia Pacific Journal of Clinica Nutrition*, 17, 91-94, 2008) . Se han encontrado residuos de pesticidas en fuentes

de agua dulce, (ALBUQUERQUE *et al.*, *Environmental Science. Processes & impacts*, 18, 779-787, 2016) frutas, productos procesados, (CABRAS, ANGIONI, *J. Agric. Food Chem.* 48, 967-973 2000) e incluso en la leche materna humana, (BEDI *et al.*, *Science of The Total Environment*, 463-464, 720-726, 2013).

[008] Martin *et al.* (2018) observaron la asociación entre el cáncer y la exposición a pesticidas y sostienen que los pesticidas pueden desempeñar un papel importante en la etiología de la neoplasia maligna del cáncer de colon, por lo que es necesario vigilar el nivel de exposición de la población a los residuos de pesticidas (Martin *et al.*, *Chemosphere* 209, 623-631, 2018).

[009] Además del uso de pesticidas, otra práctica agrícola que contribuye a la degradación del suelo son los sistemas de riego. Actualmente, casi la mitad de la producción agrícola procede de campos agrícolas de regadío. Esta práctica común puede contribuir a la acidificación del suelo, a la aceleración de la tasa de extracción de minerales del suelo o a la formación de sales, factores que dan lugar al eventual abandono de estos campos (PRESLEY *et al.*, *Soil Science Society of America Journal*, 68, 1916-1926 2004) .

[010] Así, el desarrollo de técnicas agrícolas sostenibles ha ganado protagonismo, y en este contexto, la nanotecnología surge como una solución potencial para superar los inconvenientes de la agricultura convencional, ya que sería capaz de aumentar la productividad al tiempo que se reduce el impacto ambiental (BHATTACHARYYA; NGUYEN, *Frontiers in microbiology*, 8, 1014, 2017) .

[011] En los últimos años, se ha observado una inserción gradual de los nanomateriales en la agricultura para los fertilizantes de liberación controlada, los pesticidas y herbicidas, los

sensores y la germinación y el crecimiento de las plantas (GOGOS; KNAUER; BUCHELI, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9781-9792 2012; VISHWAKARMA et al., *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*, 1, 473-500, 2017; MULLEN, *Nature Nanotechnology*, 14, 515-516 2019). Varios informes mostraron la tendencia creciente de publicaciones científicas y patentes en nanotecnología agrícola, especialmente para el manejo de enfermedades y la protección de cultivos (FRACETO 4 4, 20 2016). Además, los nanomateriales ya se utilizan con fines de mejora de plantas e ingeniería genética (AMENTA et al., *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73, 463-476 2015).

[012] Varios estudios han abordado el papel beneficioso de la nanotecnología en el sector agrícola de diversas maneras (KUMAR et al., *Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 2175-2184 2019). En un informe reciente, se destacaron las ventajas y limitaciones de los nanofertilizantes inorgánicos para la industria, así como la forma eficaz y eficiente de aplicar los nanofertilizantes y se evaluó el rendimiento económico (RALIYA et al., *Metallomics*, 7, 1584-1594, 2018).

[013] Sin embargo, el uso de la nanotecnología en aplicaciones agrícolas es todavía marginal en comparación con otros sectores industriales (CHANDRIKA et al., *Nanotechnology Prospects and Constraints in Agriculture*, 159-186, 2018). La explotación concreta de la nanotecnología en la agricultura tiene cuellos de botella que deben resolverse para garantizar la seguridad de la población. Otras razones que limitan el desarrollo de la nanotecnología en la agricultura y la alimentación son las cuestiones reglamentarias y la opinión pública (FRACETO et al., *Frontiers in Environmental Science*, 4, 20 2016).

[014] Además, la mayoría de los estudios que implican el uso de

nanofertilizantes se han centrado en la entrega de micronutrientes (zinc, cobre, hierro, manganeso), mientras que se ha descuidado la entrega inteligente de macronutrientes (potasio, nitrógeno, potasio, azufre, calcio y magnesio) (RALIYA *et al.*, *Metallomics*, 7, 1584-1594, 2018).

[015] Entre las nanoestructuras ya utilizadas en el sector agrícola, los nanomateriales inorgánicos (óxido de metal y nanopartículas metálicas NP) representan el 55% de la aplicación total en este sector, mientras que los nanoencapsulados representan el 26%, los nanocompuestos corresponden al 7% y los nanomateriales basados en el carbono (nanotubos de carbono, carbono negro y fullereno) se explotan solo en el 6% de las tecnologías reportadas (PETERS *et al.*, *Trends in Food Science & Technology*, 54, 155-164 2016).

[016] Las nanopartículas metálicas también pueden utilizarse para el control de las enfermedades de las plantas y la tolerancia al estrés. Las nanopartículas de plata, por ejemplo, han mostrado excelentes resultados contra varios patógenos de las plantas, lo que apunta a posibilidades prometedoras en la agricultura (WORRALL *et al.* *Agronomy*, 8, 258, 2018) . Sin embargo, los estudios demuestran que estos nanomateriales pueden presentar bioacumulación y transferencia trófica de gránulos y nanopartículas del suelo a través de la cadena alimentaria (Figura 1) , (DE LA TORRE ROCHE *et al.*, *Environmental Science and Technology*, 49, 11866-11874, 2015; UNRINE *et al.*, *Environmental Science and Technology*, 46, 9753-9760, 2012; RALIYA *et al.*, *Metallomics*, 1, 1584-1594, 2018) y, además, puede inducir la alteración del equilibrio de la biota del suelo (GE; SCHIMEL; HOLDENA, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6749-6758, 2012) .

[017] La bioacumulación ambiental y humana de los residuos nanoagroquímicos es un problema a resolver, ya que aumentará con la inserción progresiva de estos aditivos en la cadena de producción siendo necesario tener en cuenta todos los niveles en los que se pueden encontrar estos residuos y determinar los parámetros de seguridad para estos insumos, garantizando el mínimo impacto ambiental.

[018] En este contexto, la presente invención supera a las tecnologías que utilizan nanopartículas metálicas ya que se basa en nanopartículas de carbono, puntos de carbono, que son totalmente metabolizadas por la planta y no se transfieren dentro de la cadena alimentaria, es decir, no hay transferencia trófica.

[019] Además, las nanopartículas metálicas tienen un efecto sobre los microorganismos del suelo. Ge et al. (2012) evaluaron el efecto de las nanopartículas de TiO₂ y ZnO en la comunidad bacteriana del suelo mediante un análisis de huellas dactilares basado en el ADN (GE; SCHIMEL; HOLDEN, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6749-6758, 2012). Los resultados obtenidos mostraron que estos materiales indujeron una alteración en el equilibrio de la biota del suelo. Se observó una reducción en las poblaciones de *Rhizobiales*, *Bradyrhizobiaceae* y *Bradyrhizobium* (bacterias fijadoras de nitrógeno) y un impacto positivo en las poblaciones de *Sphingomonadaceae* y *Streptomyetaceae* (GE; SCHIMEL; HOLDEN, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6749-6758, 2012).

[020] En esta perspectiva, los nanomateriales de carbono surgen como prometedores para el desarrollo de una alternativa agrícola sostenible, ya que, presentan baja toxicidad, son biocompatibles y no son bioacumulables. Los nanomateriales de carbono han mostrado efectos beneficiosos en la germinación de las semillas

y el aumento del crecimiento de las plantas y actúan como fertilizantes. (ZHENG et al., *ACS Omega*, 2, 3958-3965, 2017) .

[021] Los puntos de carbono son una clase de nanopartículas esferoidales paracristalinas, con dimensiones inferiores a 10 nm, que se componen de un dominio poliaromático altamente ordenado (núcleo) cubierto por un borde de carbono amorfo (CHOI et al., *Chemistry - An Asian Journal*, 13, 586-598, 2018). Los puntos de carbono se aislaron por primera vez en 2004 durante el proceso de purificación de los nanotubos de carbono de pared simple (XU et al. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 12737-12737, 2004).

[022] En el Estado de la Técnica se describen algunos procesos para la preparación de puntos de carbono.

[023] Liu et al. (2016) utilizan el método electroquímico para la síntesis de puntos de carbono, utilizando electrodos de grafito como fuente de carbono (LIU et al, *Analyst*, 141, 2657-2664, 2016). Los investigadores utilizan barras de grafito como cátodo y ánodo en una célula electroquímica con hidróxido de sodio/etanol como solución electrolítica. El paso de la corriente por el circuito electroquímico da lugar a la formación de astillas de las barras de grafito que producen puntos de carbono con diferentes características de luminiscencia (longitudes de onda variadas). Como los puntos de carbono obtenidos por los autores son polidispersos, las diferencias en el comportamiento luminiscente pueden atribuirse a la variación del tamaño y a los distintos defectos superficiales. Otra desventaja del método es el bajo rendimiento de los productos, el alto coste de las barras de grafito y la necesidad de una etapa de purificación. Es importante destacar que los aspectos mencionados anteriormente hacen inviable la explotación comercial de los puntos de carbono

obtenidos por electrólisis.

[024] También se ha descrito la ruta electroquímica, (RAMILA DEVI; VIGNESH KUMAR; SUNDRAMOORTHY, *Journal of the Electrochemical Society*, 165, G3112-G3119, 2018) proponiendo variaciones en la composición de la solución electrolítica para conseguir otras propiedades. Sin embargo, una limitación evidente en el método electroquímico es la amplia distribución del tamaño de las partículas y la morfología que al final de la síntesis en general se requiere una mayor separación y purificación del material obtenido (RAMILA DEVI; VIGNESH KUMAR; SUNDRAMOORTHY, *Journal of the Electrochemical Society*, 165, G3112-G3119, 2018).

[025] El hollín generado en numerosos procesos reactivos que implican fuentes de carbono, como la combustión o la quema, también se ha utilizado como precursor para sintetizar los puntos de carbono. Estos materiales/subproductos se colocaron en sistemas de reflujo con ácidos concentrados (como el ácido nítrico) y luego se separaron las nanopartículas más pequeñas formadas (LIU et al., *Angewandte Chemie*, 46, 64736475, 2007) . El fuerte carácter oxidante del ácido es crucial para disolver los agregados de carbono del hollín; el ácido reacciona posteriormente con los coloides de carbono formados para producir grupos superficiales ricos en oxígeno y nitrógeno y defectos que contribuyen a las características de emisión fluorescente de las partículas. Sin embargo, las técnicas basadas en materiales como el hollín o subproductos ricos en carbono muestran bajos rendimientos en la síntesis de puntos de carbono y forman grandes cantidades de residuos tóxicos.

[026] El tratamiento hidrotérmico de las fuentes de carbono se ha convertido en el procedimiento más común para la producción de puntos de carbono. Este enfoque permite la generación de

nanopartículas a partir de una variedad de fuentes como moléculas y residuos (DE YRO *et al.*, *AIP Conference Proceeddlns*, 2083, 0200007, 2019).

[027] El núcleo de la síntesis hidrotérmico es la formación de puntos de carbono en un proceso que comienza a altas temperaturas y promueve la nucleación/condensación de moléculas ricas en carbono que actúan como bloques de construcción para la formación de un núcleo grafítico. Otra característica importante del esquema de síntesis hidrotérmico es que algunos residuos de los reactivos ricos en carbono utilizados se mantienen en la superficie del núcleo grafítico, otorgando así una variedad de partículas con funcionalidades y propiedades ópticas controlables (WANG *et al.*, *Analytical Methods*, 10, 2775-2784, 2018) .

[028] A contraposición a los métodos anteriormente presentados, la ruta hidrotérmica presenta partículas con una distribución de tamaño estrecha y uniformidad en el comportamiento luminiscente, sin embargo, los factores limitantes de esta técnica se centran en el tiempo de síntesis generalmente elevado y el bajo rendimiento que está condicionado por el uso de sistemas que controlan la presión interna.

[029] De Medeiros *et al.* (2019) obtuvieron puntos de carbono mediante una ruta hidrotérmica asistida por microondas. La radiación de microondas sustituye a la fuente de calor utilizada en el método hidrotérmico convencional. Los puntos de carbono generados mediante microondas presentan una elevada luminiscencia tanto en solución como en fase sólida. El tiempo de síntesis es muy reducido, ya que la cantidad de energía que se gasta durante el proceso es muy alta y se puede controlar en el propio equipo. Las partículas formadas tienen características similares a las obtenidas por vía hidrotérmica, sin embargo, los rendimientos de

la reacción son reducidos y limitados a la robustez de los accesorios utilizados para la síntesis (DE MEDEIROS *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C*, 7, 7175-7195, 2019). Todos estos aspectos dificultan la producción a gran escala de puntos de carbono por reacción hidrotérmica.

[030] La carbonización a alta temperatura para la fabricación de puntos de carbono se ha realizado en disolventes distintos del agua. Investigadores del Max-Planck Institut for Polymerforschung han demostrado que el tratamiento térmico de una fuente de carbono como el ácido cítrico disperso en un disolvente no coordinado, como los disolventes orgánicos octadeceno y 1-hexadecilamina, produce puntos de carbono de alta luminiscencia (WANG *et al.*, *Chemistry of Materials*, 22, 4528-4530, 2010). En cambio, los residuos de síntesis se convierten en un obstáculo para el aumento de la producción de puntos de carbono en estas condiciones.

[031] Las técnicas anteriormente mencionadas, aunque eficaces en la producción de puntos de carbono, comparten impedimentos en cuanto a la producción de una gran cantidad de material con características uniformes y seleccionables. Incluso los que tienen un alto rendimiento de síntesis se enfrentan a dificultades de reproducibilidad y calidad del material formado, como es el caso de los procesos electroquímicos e hidrotérmicos. Es importante destacar que el método propuesto por la presente invención permite la producción a gran escala de puntos de carbono si difiere de los reportados anteriormente por no utilizar el método hidrotérmico, reactivos tóxicos y producir residuos. En esta invención, la producción de puntos de carbono se produce mediante una reacción de flujo continuo, en un circuito cerrado que garantiza la reproducibilidad y los altos rendimientos de la reacción. El método propuesto reutiliza toda el agua, aprovecha los residuos y no genera gases de efecto invernadero.

[032] Además de la técnica de obtención de los puntos de carbono, es importante destacar que la explotación de los puntos de carbono en medios biológicos requiere atención, ya que la materia prima y las condiciones de síntesis son factores que influyen en la composición superficial, la funcionalidad y la actividad biológica.

[033] Algunos ejemplos demuestran que los métodos hidrotérmicos dan como resultado puntos de carbono que contienen fragmentos de la molécula precursora en sus superficies. Por ejemplo, en el artículo publicado por Zhao et al. (2017), los puntos de carbono producidos por pirólisis de aceite de yema de huevo muestran una actividad antihemorrágica similar a la del fármaco Hemocoagulasa (Zhao, Y., Zhang, Y., Liu, X. et al. *Scientific Report*, 7, 4452, 2017).

[034] En el documento de patente CN103980894A, los puntos de carbono producidos a partir de ácido fólico por vía hidrotérmica fueron capaces de reconocer selectivamente las células tumorales al interactuar específicamente con las proteínas de la membrana plasmática que interactúan con el ácido fólico (Receptores de Folato). Los respectivos puntos de carbono presentaban todas las características morfológicas y fisicoquímicas similares a otras nanopartículas producidas a partir de otros precursores. Sin embargo, la presencia de fragmentos de ácido fólico en la superficie los hace únicos y pasivos de la protección de patentes.

[035] En otro ejemplo, los puntos de carbono producidos a partir de la pirólisis de la membrana del huevo de gallina fueron capaces de reconocer selectivamente fragmentos de ADN y ARN (Pramanik et al. *PCCP*, 20, 20476, 2018). Cabe destacar que los puntos de carbono producidos por pirólisis de otras fuentes de carbono no presentan esta capacidad selectiva para reconocer los ácidos nucleicos.

[036] En la publicación internacional WO/2018/160142 Los puntos de carbono producidos a partir de la condensación de polioxietileno en condiciones ácidas dieron lugar a un nanomaterial con propiedades antibióticas y se incorporaron a una película polimérica inerte. Una vez más, las características morfológicas y fisicoquímicas son similares a los puntos de carbono producidos por otras fuentes de carbono, sin embargo, las propiedades superficiales de las partículas dieron lugar a una actividad biológica específica que permitió su protección.

[037] Así, aunque los aspectos fisicoquímicos y morfológicos sugieren que los puntos de carbono en general son sólo esferas de carbono, el proceso sintético y la fuente de carbono influyen en la composición de la superficie y en las propiedades biológicas de los puntos de carbono.

[038] El uso de puntos de carbono en la agricultura como fertilizantes fue propuesto en el trabajo publicado por Zheng y colaboradores (2017) que informa del uso del polen como precursor de nanopartículas (ZHENG *et al.*, *ACS Omega*, 2, 3958-3965, 2017)). Se han realizado pruebas en lechugas hidropónicas y muestran que las plantas tratadas con una solución de $20 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$ muestran un crecimiento de aproximadamente el 50%. Los resultados no sugieren una interacción selectiva con proteínas con proteínas o enzimas responsables del crecimiento de las plantas. Los autores se limitan a proponer el uso de puntos de carbono como fertilizantes.

[039] En el trabajo publicado por Li y colaboradores (2018) cinco puntos de carbono producidos a partir de la electrolisis del grafito mostraron una composición superficial única y respuestas distintas en el arroz (LI *et al.*, *ACS, Applied Biomaterials*, 1, 663-672, 2018) .

[040] Se describieron diferencias significativas en las

actividades de crecimiento de las plantas entre las partículas, lo que demuestra que, aunque los tamaños y las características fisicoquímicas son similares, cada partícula presenta características únicas. Además, se observó que los puntos de carbono sintetizados interactuaban con el material genético de la planta, promoviendo la expresión del gen de crecimiento 0s06g32600. También se observó que el punto C interactuaba con la proteína RuBisCo, encargada de fijar el CO₂ del aire (LI et al., ACS, *Applied Biomaterials*, 1, 663-672, 2018).

[041] Por todos estos factores mencionados anteriormente, la presente invención supera a las demás tecnologías al tratarse de puntos de carbono con características específicas que imitan las respuestas similares a las fitohormonas que interactúan específicamente con las proteínas de la membrana plasmática y que se obtuvieron mediante un proceso sintético organocatalizado desarrollado exclusivamente para promover el crecimiento acelerado de las plantas y transportar macro y micronutrientes directamente a las células de las plantas .

[042] Los puntos de carbono descritos en la presente invención actúan como bioestimulantes, potenciando la absorción de nutrientes, mejorando el uso del agua por parte de la planta, y aumentando las tasas de fotosíntesis, ya que, mantienen los estomas abiertos durante más tiempo y promueven un crecimiento acelerado de los cultivos probados.

[043] La actividad biológica de los puntos de carbono propuestos aquí son únicos y sugieren que la acción de las partículas en el metabolismo de la planta ocurre a nivel molecular similar a las fitohormonas como las Auxinas, Guibberlinas y Citoquininas y otras.

[044] Dicho esto, el Estado de la Técnica no predice el

desarrollo de bioestimulantes con actividad mimética de fitohormonas que activan la proteína H-ATPasa de la membrana plasmática, como se presenta en la presente invención.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LAS FIGURAS [045] La invención puede entenderse mejor sobre la base de las Figuras 1 a 19, cuya descripción sigue a continuación:

[046] La Figura 1 ilustra el proceso de eutrofización de la cadena alimentaria por nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos.

[047] La Figura 2 presenta el esquema de producción del bioestimulante a partir del método desarrollado.

[048] La Figura 3 presenta el espectro infrarrojo por transformada de Fourier de los puntos de carbono sintetizados por el método desarrollado.

[049] La Figura 4 muestra la formación de los puntos de carbono y el mantenimiento de los grupos superficiales a partir de los precursores de síntesis.

[050] La Figura 5 presenta los espectros de absorción bajo regiones UV-Vis y de emisión de excitación en el rango de 360nm a 620nm de los puntos de carbono

al espectro de Absorción de la

[051] La Figura 6 presenta la clorofila a y b.

[052] La Figura 7 presenta la en A, el espectro XPS y el composición del bioestimulante recuento de los macronutrientes Nitrógeno, Fósforo y Potasio de (N, P, K). En B, espectro de C alta resolución de Fósforo. En e las imágenes de microscopía de electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y en D la distribución del diámetro de las partículas.

[053] La Figura 8 presenta el potencial zeta (ζ) y el diámetro hidrodinámico en función del volumen de solución nutritiva (mL) añadido en un volumen de 10 ml de puntos de carbono con una concentración de 50 mg/L.

[054] La Figura 9 presenta la distribución de las plantas P1 (blanco) y P2 (azul) en los cuatro bloques.

[055] La Figura 10 presenta las distribuciones de muestras del grupo P1 tratado con puntos de carbono a diferentes concentraciones después de 17 días (A), 28 días (B), 42 días (C) y 56 días (D) desde el inicio del tratamiento.

[056] La Figura 11 presenta las distribuciones de muestras del grupo P2 tratado con puntos de carbono a diferentes concentraciones después de 17 días (A), 28 días (B), 42 días (C) y 56 días (D) desde el inicio del tratamiento.

[057] La figura 12 presenta la distribución de los tratamientos en el invernadero de los grupos B1, B2, B3 y B4.

[058] La Figura 13 presenta el efecto del tratamiento con puntos de carbono, a diferentes concentraciones, sobre la tasa fotosintética, a la derecha, y sobre la eficiencia en el uso del agua, a la izquierda, para los bloques B1 y B2 del tomate 'Finestra' .

[059] La Figura 14 presenta el efecto del tratamiento con puntos de carbono, a diferentes concentraciones, sobre la tasa fotosintética, a la derecha, y sobre la eficiencia en el uso del agua, a la izquierda, para los bloques B3 y B4 del tomate 'Finestra' .

[060] La Figura 15 presenta el efecto del tratamiento con puntos de carbono, en diferentes concentraciones, sobre la eficiencia del uso del agua en los cultivos hidropónicos de lechuga.

[061] La Figura 16 presenta el efecto de la concentración de

puntos de carbono sobre la masa seca de las raíces de las plántulas de maíz (RDM).

[062] La Figura 17 ilustra el sistema de cultivo de maíz en macetas Leonards, con aplicación de puntos de carbono a través de una solución nutritiva.

[063] La Figura 18 presenta el efecto de la concentración de 100 mg/L de puntos de carbono sobre la fotosíntesis neta (A) , la conductancia estomática (B), la transpiración (C) y la eficiencia en el uso del agua (D).

[064] La Figura 19 presenta el porcentaje de aumento o disminución de nutrientes en plantas de maíz utilizando la solución de Hoagland con puntos de carbono.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION [065] La presente invención se refiere a un potenciador de la fotosíntesis carbonoso con propiedades fotoluminiscentes (puntos de carbono) para ser utilizado como bioestimulante y biofertilizante, ya que cuando se aplica por vía foliar o radicular puede desencadenar respuestas fisiológicas que mejoran el desarrollo de la planta. Estas respuestas fisiológicas se observan en las variables fotosintéticas, en las características de las raíces de la planta, así como en la absorción de micro y macro nutrientes esenciales para el ciclo de desarrollo.

[066] Además, el producto de la presente invención presenta alta solubilidad en agua y biodegradabilidad, es un material totalmente metabolizado por las plantas, por lo tanto, no es bioacumulativo, su uso reduce el impacto adverso de la transferencia trófica de las nanopartículas convencionales en la cadena alimentaria, y no es tóxico y, por esta razón, reduce el impacto ambiental en relación a la contaminación del suelo y del agua en comparación con los agroquímicos convencionales, lo que le da mayor potencial de aplicación como insumo agrícola.

[067] Los nanomateriales producidos funcionan como fuente de carbono orgánico y actúan como portadores de micro y

macronutrientes anclados en su estructura. Durante el proceso de síntesis del bottom-up se controla el tamaño de los nanomateriales y la activación de los sitios activos en su estructura. A través del conocimiento de la ingeniería de superficie se construyen estos sitios activos que son propensos a recibir los nutrientes y/o estimulantes que serán entregados con mayor eficiencia a los más diversos tipos de cultivos agrícolas, debido a la bioafinidad de las plantas con el nanocompuesto y la facilidad para metabolizarlos.

[068] Los nanomateriales presentados en esta tecnología se obtienen por el método en flujo utilizando la asociación de reactores como se muestra en la Figura 2. Para un mejor acondicionamiento tras el proceso de síntesis, el material se somete a una operación más, el secado.

[069] Uno de los métodos de la presente invención se refiere al proceso de obtención de puntos de carbono, que es un método versátil ya que permite el uso de diferentes matrices ricas en carbono como material de partida, tales como glutaminas, ácidos orgánicos, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido oleico ácido málico, ácido fumárico, ácido isocítrico, almidón de maíz, también se puede trabajar con coprocesamiento utilizando fuentes alternativas que puedan proporcionar una composición adecuada de los reactivos, compuestos con los mismos grupos funcionales y cadenas cortas, siendo preferentemente el ácido cítrico y tartárico.

[El método propuesto es un proceso rápido comparado con la ruta convencional (ruta hidrotérmica), ya que el método propuesto no requiere un largo tiempo de estabilización como en la ruta hidrotérmica para iniciar el proceso de carbonización y el crecimiento de las partículas, además es un método, económico porque se puede producir en un proceso continuo. Se utiliza agua

como disolvente y no se generan residuos tóxicos de síntesis al final del proceso.

[071] El método utilizado en la síntesis de puntos de carbono consiste en un proceso que implica una transformación físico-química. La ruta utilizada se considera químicamente verde, porque utiliza agua como disolvente y no genera residuos tóxicos de la síntesis.

[072] En general, dicha modalidad puede entenderse a través del proceso de obtención de puntos de carbono que consiste en reacciones químicas catalizadas y procesos de flujo.

[073] Las nanopartículas se obtienen a partir de diferentes fuentes de carbono, y se pueden usar ácido cítrico, glucosa, aminoácidos y residuos agrícolas, como cáscaras de frutas, bagazo y estiércol animal, siendo preferible el ácido cítrico, debido a la reacción de neutralización ácido-base parcial en la que se utiliza una solución básica, fuente de grupo funcional hidroxilo, para la formación de la sal de los ácidos y contribuye a la formación de varios puntos de nucleación a través de la repulsión electrostática inducida por los iones (OH^-) en la solución. Las bases utilizadas pueden ser hidróxido de calcio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, anilina, metalamina, urea y tiourea, siendo preferible el hidróxido de amonio.

[074] Una solución ácida, fuente de carbono, y una solución básica, fuente de grupo funcional, se preparan y se colocan en el sistema de flujo.

[075] Con el uso de una bomba de dosificación y una válvula, estas soluciones se dosifican en un mezclador, que luego presenta otra región de recipiente de mezcla donde se permite recibir el

reciclaje y los dopantes (micro y macronutrientes o estimulantes). Los reactivos después de pasar por los mezcladores son bombeados a un reactor tubular tipo flujo en pistón (PFR) el cual está equipado con una válvula que restringe la salida del material, manteniendo una presión constante en su interior, evitando la vaporización de los reactivos, ya que este reactor se calienta en un rango de 100 a 250 °C, preferiblemente a 150 °C.

[076] El reactor PFR debe tener un diámetro reducido de sólo unos pocos milímetros y también estar construido con material de baja rugosidad para reducir la caída de presión durante el flujo del material. Otro factor importante del proceso es mantener un régimen de flujo hidrodinámico turbulento, todo esto debe ser calculado por la ecuación de movimiento de Ecuación de *Bernoulli*, ya que este reactor debe ser alojado dentro de un invernadero para calentar la mezcla.

[077] Este reactor debe ser calentado a una temperatura entre 100 y 250 °C, dependiendo de la concentración del material utilizado, la presión dentro del reactor es controlada por la válvula de salida evitando que la solución hierva, la presión variará de reacción a reacción dependiendo de la densidad de las sales involucradas. Esta presión es elevada, por lo que el material de construcción del reactor debe soportar una presión de hasta 5 bares. El flujo de material que sale de ese primer reactor, el tubular, descarga en un reactor tanque agitado continuo (CSTR) que también está calentado y posee agitación, el flujo de salida de ese reactor pasa por un sistema de separación, que funciona por diferencia de densidad hidrociclón o decantador que permite retirar el producto terminado por el *overflow* y devuelve la corriente de *underflow* para el reflujo.

[078] Si es necesario, un reflujo del material hasta que se establezcan las condiciones óptimas de operación. El producto formado tiene una densidad inferior a la solución de sales precursoras, por lo que el producto puede ser separado por este principio, retirando el sobrenadante y recirculando el material de fondo, insertando antes del reactor sumando la corriente inicial de los reactivos. Hasta el proceso de estabilización en que el material queda en reflujo dura entre 0,5 y 2 horas, siendo preferentemente 1 hora, a partir de ese período comienza a alterar la densidad del material y a formar el producto.

[079] Este proceso presenta un rendimiento del 95% (713 g después de 2 horas de ciclo. Esta cantidad de material es suficiente para ser aplicada en 24 hectáreas.

[080] Este producto puede almacenarse en forma líquida o pasar por un proceso de secado, lo cual el material expande su superficie, aumentando su volumen aproximadamente 05 veces.

[081] La tecnología de producción de Carbon-dos presenta características de escalado que permiten una transición factible a escala industrial sin impactos negativos en la calidad de los puntos de carbono formados. Las pruebas realizadas haciendo *scale-up* de 100 veces la producción del punto de carbono producido en banco verificaron la posible producción y el mantenimiento de las mismas propiedades y calidades. Bajo una alta demanda de producción de bajo impacto ambiental, como se requiere en la industria de insumos agrícolas, esta tecnología es disruptiva y consistente con las nuevas demandas de producción de hoy.

[082] La versatilidad es también una de las principales características de la plataforma de producción desarrollada, que permite variar su composición y propiedades para satisfacer las demandas de la cadena de producción.

[083] Los puntos de carbono obtenidos por este proceso presentan una alta solubilidad en agua debido a la presencia de grupos hidrófilos presentes en las moléculas precursoras de la síntesis, como puede confirmarse por el espectro infrarrojo presentado en la Figura 3.

[084] Los grupos superficiales de las nanopartículas tienen, además del carácter hidrofílico, potencial de complejación de iones en solución (Figura 4). Tanto los macronutrientes (potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y azufre), que tienen una gran demanda por parte de la planta, como los micronutrientes (manganeso, boro, zinc, hierro, cobre, molibdeno y cloro), que tienen una demanda en menor cantidad, pueden ser añadidos en el proceso de preparación de los puntos de carbono, así como acomplejados por los grupos superficiales después de la síntesis.

[085] Además, son materiales biodegradables, estas características les dan más potencial de aplicación como insumo agrícola.

[086] Por lo tanto, otra modalidad de la presente invención se refiere al uso de la nanoformulación basada en puntos de carbono como potentes potenciadores de la fotosíntesis, bioestimulantes y biofertilizantes organominerales. La tecnología presentada en este documento es totalmente no tóxica, biocompatible, no bioacumulable y producida de forma sostenible utilizando los principios de la nanotecnología verde. Los resultados de las pruebas demuestran un aumento de la eficiencia de la fotosíntesis de alrededor del 60%, un aumento de la eficiencia del uso del agua del 50% y un aumento de la masa de raíces del 50%. Los nanomateriales producidos y dopados con elementos químicos esenciales aportan simultáneamente nutrientes a las plantas y mejoran sus aspectos fisiológicos, reduciendo los impactos

adversos de la aplicación convencional de fertilizantes. Es importante destacar que la tecnología presentada supera las limitaciones relacionadas con la viabilidad económica, la escalabilidad de la producción y la seguridad medioambiental, que son barreras para el uso sostenible de la nanotecnología en la agricultura.

[087] El uso de los puntos de carbono como potenciadores de la fotosíntesis se debe a sus propiedades espectroscópicas. La introducción de reactivos nitrogenados aromáticos, que promueven la formación de enlaces $C=N/C=O$, es responsable de la absorción y las emisiones multiestado en la región azul/verde/roja (Figura 5).

[088] Las clorofilas a y b presentan dos bandas de absorción centradas en las regiones espectrales correspondientes al azul (~ 440 nm) y al rojo (~ 650 nm), pero muestran una respuesta espectral muy baja para la región verde (Figura 6). Los puntos de carbono sintetizados muestran una fuerte absorción en la región verde (532 nm) y una emisión centrada en 645 nm, esta adaptación espectral conduce a un aumento de la productividad de los cultivos debido a un mejor aprovechamiento de la luz solar.

EJEMPLOS

[089] Los ejemplos siguientes se representan para ilustrar la mejor ejecución de la invención. Cabe señalar que la presente invención no se limita a los ejemplos citados y puede utilizarse en todas las aplicaciones descritas o en cualquier otra variación equivalente.

EJEMPLO 1: Síntesis de puntos de carbono [090] La aplicación en la agricultura exige una cantidad mayor que a escala de laboratorio. Así que el proceso se amplió y se produjo en una estructura piloto, como se muestra en la Figura 1. Se disolvieron 500 g de glucosa y 550 mL de hidróxido de amonio en 1000 mL de

agua y se colocaron en el sistema de flujo como se muestra en la Figura 1. La temperatura de trabajo se fijó en 150°C y el producto final con un rendimiento del 95% (713 g después de 2 horas de ciclo. Esta cantidad de material es suficiente para ser aplicada en 24 hectáreas.

EJEMPLO 2: Síntesis de los puntos de carbono híbridos que contienen macronutrientes [091] El proceso inicialmente no había un segundo mezclador, pero con la necesidad de reciclar y la demanda de inserción de nutrientes se añadió después del primer mezclador un segundo que recibe las corrientes ácida y básica entonces se calcula la dosis del reciclado y también del dopante para tener una proporción estequiométrica, esto permite producir tanto puntos de carbono puros como puntos de carbono híbridos con los más diversos dopantes insertados en el segundo mezclador.

[092] La Figura 7a muestra el espectro XPS y la composición de la muestra que contiene los macronutrientes. El espectro XPS de alta resolución de la Figura 7b muestra que el fósforo (P) se ha incorporado a la matriz carbonosa. Las bandas centradas en 131,25 y 132,25 eV corresponden a los grupos -C3-PO y -C-PO3 respectivamente. En la Figura 7c y d se muestran imágenes de las nanopartículas con morfologías esferoidales y tamaño medio de 5 nm. Este resultado indica que el fósforo puede ser entregado directamente a la maquinaria celular de la planta y que el proceso de biodisponibilidad del nutriente es similar al del nitrógeno del nutriente que depende de la metabolización del nanomaterial por la planta. Este nanomaterial actúa simultáneamente como potenciador de la fotosíntesis, bioestimulante/biofertilizante y fuente de macronutrientes (fertilizante organomineral). Además, es totalmente soluble en agua, no es tóxico y tiene la ventaja de reducir el impacto medioambiental causado por el uso excesivo de fertilizantes en el suelo. Cabe destacar que no existe una tecnología similar en la literatura hasta la publicación de la presente invención.

EJEMPLO 3: Evaluación del potencial portador de nutrientes [093] Se investiga el potencial portador de nutrientes de los puntos de carbono, ya que, en solución los grupos carboxilo (COO⁻) mayoritarios en la superficie confieren una carga negativa y por

tanto una repulsión que favorece la estabilidad coloidal del sistema. Los metales clasificados como micro y macro nutrientes tienen una carga positiva en solución y pueden ser atraídos por los grupos carboxilos de las partículas.

[094] Para analizar el comportamiento superficial y la estabilidad de los puntos de carbono frente a la adición de iones, se realizan mediciones del potencial zeta (ζ) y del diámetro hidrodinámico con la adición creciente de solución nutritiva. Un volumen de 10 mL de puntos de carbono con una concentración de 50 mg/L se titula con una solución estándar de *Hoagland* (1/2 fuerza). En la Figura 8 se puede observar el comportamiento del potencial zeta y del diámetro hidrodinámico a medida que se añade una mayor cantidad de iones.

[095] Como se esperaba, la disminución del potencial indica que los iones metálicos positivos se unen a la superficie, lo que resulta en una disminución gradual del potencial. Sin embargo, el comportamiento de la curva tiende a mantenerse constante a partir de un determinado volumen, como se observa en la Figura 8. Incluso a una fuerza iónica elevada, las partículas presentan estabilidad, confirmada por la estrecha variación del diámetro hidrodinámico. Estas características indican que los puntos de carbono pueden aplicarse junto con soluciones nutritivas estándar para promover el transporte de nutrientes y evitar la lixiviación de los mismos, como ocurre en la agricultura convencional. La estabilidad coloidal también refuerza la posibilidad de comercializar esta tecnología como potenciador de la fotosíntesis, bioestimulante/biofertilizante y fertilizante organomineral líquido.

EJEMPLO 4: Ensayo agronómico [096] Se selecciona el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum*) para mostrar el efecto del nanomaterial en el desarrollo de la planta, ya que este cultivo ha sido objeto de muchas críticas por los problemas de residuos de pesticidas en los frutos.

[097] El efecto de los puntos de carbono sobre los coeficientes de producción de los pimientos se establece en un esquema factorial 2x4, donde dos son los modos de aplicación (una sola aplicación y parcelada en cuatro veces) y cuatro concentraciones que variaron de 0, 25, 50 y 100 mg.L⁻¹ de puntos de carbono. El ensayo está organizado en el diseño de bloques aleatorios, con cuatro repeticiones que hacen un total de 32 unidades experimentales.

[098] Las unidades experimentales consisten en macetas de plástico de 5,0 dm³ llenas de una mezcla de sustrato inerte y una planta cada una. Los nutrientes y el agua se añaden por fertirrigación añadiendo 400 mL de solución nutritiva completa cuatro veces al día.

[099] Las semillas de pimiento se siembran en una bandeja de germinación y 27 días después de la siembra las plántulas emergentes se trasplantan a macetas de 5 litros previamente rellenas con sustrato inerte que tiene en su composición turba, vermiculita, residuos orgánicos, residuos orgánicos agroindustriales y caliza. Se seleccionan 32 plántulas con 19 días de trasplante para iniciar las aplicaciones de los puntos de carbono, el criterio de tamaño y desarrollo adoptado es el mismo para todas las plántulas en el acto de la selección.

[100] Las concentraciones de puntos de carbono aplicadas (0 a 100 mg.L⁻¹) están definidas a partir de ensayos anteriores. El volumen máximo de solución aplicado para la posterior cuantificación de la masa de puntos de carbono es de 200 mL para cada concentración por planta. Las plantas se dividen en dos grupos P1 y P2, donde las plantas clasificadas como P1 reciben una única dosis de la solución (200 mL) y las plantas P2 reciben dosis graduales (50 mL) cada quince días hasta alcanzar el volumen

máximo de solución (200 mL). La Figura 9 representa la división de las plantas en cuatro bloques para dar aleatoriedad a los tratamientos.

[101] Las plantas se acondicionan en un invernadero de cristal y se riegan igualmente cuatro veces al día. La forma de aplicación de las soluciones de puntos de carbono es por pulverización foliar, de manera que el exceso de solución pueda correr libremente hacia el sustrato de la planta.

[102] Para medir el efecto de los puntos de carbono en el crecimiento relativo de las plantas se utiliza una cinta métrica graduada en milímetros para medir el tamaño a lo largo del ensayo. El primer día, antes del inicio de las aplicaciones, se recoge la talla inicial y se aplican las primeras concentraciones. El grupo P1 recibe un volumen de 200 mL en cada planta y el grupo P2 recibe la primera dosis de 50 mL. El procedimiento de recogida de tamaño se realiza cada quince días en el mismo día de las aplicaciones del grupo P2 hasta completar el volumen de 200 mL.

[103] Para realizar el cálculo del crecimiento relativo se utilizó la Ecuación 1, donde "h_{final}" representa la medición realizada después de la aplicación del tratamiento y "h_{inicial}" el promedio realizado antes de la aplicación de los tratamientos.

Ecuación 1:
$$\frac{(h_{final} - h_{inicial})}{h_{inicial}} * 100$$

[104] Los datos recogidos se tabulan en una hoja de cálculo para la aplicación de pruebas estadísticas. La primera prueba estadística aplicada es la prueba de normalidad de *Shapiro-Wilk*, que indicó un tipo de distribución no normal para los datos recogidos. A continuación, se utiliza una estadística no paramétrica, la prueba de *Kruskall-Wallis* de muestras independientes, para evaluar los resultados. (Figuras 10). En vista de ello, la comparación de las medianas es más adecuada para identificar las diferencias estadísticas y concluir las observaciones realizadas.

[105] El efecto de la concentración y la cantidad de puntos de carbono a lo largo del desarrollo fisiológico de la planta se muestra a través de los datos estadísticos de los grupos P1 y P2 están separados.

[106] Desde los análisis estadísticos realizados se puede concluir que para el grupo P1 (Figura 10), donde se aplica una dosis única de 200 mL por planta al inicio del ensayo, existe una diferencia estadística entre el tratamiento de concentración 100 mg*L⁻¹ y el tratamiento control de 0 mg*L⁻¹ después de 56 días de la aplicación. Hubo un mayor crecimiento relativo del pimiento cuando se utilizó la mayor concentración de puntos de carbono (100 mg.L⁻¹) en comparación con los otros tratamientos, especialmente el control, es decir, sin la aplicación del nanobioestimulante (0,0 mg.L⁻¹).

[107] Por otro lado, cuando se analizan los resultados del

grupo P2 (Figura 11), en el que se aplican 50 mL de cada concentración cada quince días hasta alcanzar un volumen de 200 mL, se observan diferencias estadísticas a los 42 y 56 días entre el tratamiento con una concentración de $25 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$ y el tratamiento control, $0 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$. Una concentración más baja aplicada de forma fraccionada contribuye más eficazmente al crecimiento relativo en comparación con la concentración de control y los otros tratamientos.

EJEMPLO 4: Efecto de puntos de carbono sobre la tasa fotosintética utilizando el tomate 'Finestra'.

[108] Se muestra el efecto de los puntos de carbono en la tasa fotosintética utilizando un sistema portátil para medir la fotosíntesis mediante un analizador de gas infrarrojo. El punto clave de estas mediciones es la relación entre la asimilación de CO_2 y la pérdida de agua por transpiración de la hoja a través de los estomas. La respuesta específica en el infrarrojo tanto para el CO_2 como para el agua se utiliza para desarrollar sensores que toman lecturas infrarrojas durante el intercambio de gases (*Infrared Gas- exchange Analyzers - IRGAs*) .

[109] Simultáneamente es posible supervisar los cambios en el CO_2 y el vapor de agua a través de la hoja, proporcionando así una medición precisa e integrada *in vivo* de la fotosíntesis neta y la transpiración de la muestra cuando se ilumina con un equipo en una cámara de exploración que sujeta la hoja sin dañarla, y también de la tasa de respiración mitocondrial y la transpiración residual cuando la muestra está en un entorno oscuro en la cámara de lectura.

[110] El efecto de los puntos de carbono en la fotosíntesis se observa en el tomate 'Finestra', un híbrido Fi desarrollado por Embrapa Hortaliças.

[111] Las plántulas de tomate se trasplantan a macetas 25 días después de la siembra y la cosecha de los frutos comienza 60 días después del trasplante.

[112] A los 48 días de la siembra, se seleccionan 5 bandejas con plántulas para iniciar las aplicaciones de bioestimulantes. Las concentraciones para este ensayo son: 0 mg^{L⁻¹} (sólo agua); 0,5 mg^{L⁻¹}; 2,5 mg^{L⁻¹}; 5 mg^{L⁻¹} y 10 mg^{L⁻¹}. La forma de aplicación es por pulverización foliar con la posibilidad de que el exceso de solución fluya hacia el sustrato. El sustrato utilizado para rellenar las bandejas y macetas está compuesto por corteza de pino bioestabilizada, vermiculita, carbón vegetal molido, agua y espuma fenólica.

[113] La primera dosis aplicada en las plántulas ocurre después de la emergencia de las hojas verdaderas aún en la bandeja de germinación, se rocía una sola dosis de 250 mL en la bandeja de manera uniforme para cada tratamiento, el procedimiento se repite durante tres días consecutivos.

[114] De las bandejas previamente tratadas, se seleccionan 20 plántulas de cada tratamiento (0; 0,5; 2,5; 5,0; 10 mg^{L⁻¹}) para trasplantarlas en macetas de 15 litros con sustrato. Se distribuyen las plántulas al azar en cuatro bloques contando con cuatro repeticiones por bloque para cada tratamiento y un total de 80 plántulas. Los bloques B1 y B2 se expusieron a la luz incidente en el invernadero, mientras que los bloques B3 y B4 se cubrieron con tela de sombra (Figura 12).

[115] La Ecuación 1, mostrada en el ejemplo anterior, se utiliza para calcular el crecimiento relativo.

[116] Tras el trasplante a las macetas, las plántulas pasan por un periodo de asentamiento de 15 días en el sustrato, momento en el que se reanudan las aplicaciones. Para la fase de crecimiento de las plantas de tomate, se aplica una dosis de 500

mL sobre las hojas con la posibilidad de que la solución entre en contacto con el sustrato. Los tratamientos de la misma dosis (concentración) se separan y agrupan para pulverizar la solución de manera uniforme. A continuación, los tratamientos se distribuyen de nuevo en sus respectivos bancos originales, teniendo todo el cuidado de que las macetas con la tela de sombreado no se mezclen con las que no la tienen al volver al banco. El procedimiento de aplicación se repite semanalmente durante cuatro veces más siempre con una sola dosis.

[117] La recogida de datos se realiza tras la finalización de las aplicaciones en el periodo matutino y se realizan estudios fisiológicos sobre los mecanismos e intensidades de la tasa fotosintética y la transpiración a lo largo del día. Las condiciones de lectura se conservan para todos los tratamientos y al final de los análisis se extraen los datos para aplicar las pruebas estadísticas en las variables de interés que proporciona el equipo.

[118] Las Figuras 13 y 14 muestran los efectos de los tratamientos. La primera prueba estadística aplicada es la prueba de normalidad de *Shapiro-Wilk* que indica un tipo de distribución no normal para los datos recogidos. A continuación, se utiliza un estadístico no paramétrico, la prueba de *Kruskall-Wallis* para muestras independientes, para evaluar los

resultados. Por ello, la comparación de las medianas resulta más adecuada para identificar las diferencias estadísticas y concluir las observaciones realizadas.

[119] El efecto conjunto de la concentración de puntos de carbono y de la luminosidad natural sobre la fotosíntesis de la planta de tomate 'Finestra' se muestra mediante la comparación del grupo tratado con la tela de sombra (B3 y B4) y el grupo

tratado sin tela de sombra (B1 y B2). Como se ha explicado anteriormente, los puntos de carbono poseen propiedades luminiscentes de absorción y emisión de luz que pueden ser aprovechadas en el proceso de absorción de luz por la clorofila.

[120] Los datos obtenidos para los bloques B1 y B2 muestran que existe una tendencia de aumento de la tasa fotosintética para los tratamientos de concentración $2,5 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$ y $5 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$ (Figura 13) .

[121] La eficiencia en el uso del agua es un parámetro que no proporcionan directamente los IRGAs, pero que puede obtenerse dividiendo el valor de la fotosíntesis (Pho) por la conductancia estomática (Ci) . Así, la eficiencia en el uso del agua en los tratamientos B1 y B2 también presenta una tendencia a aumentar para las concentraciones de $2,5 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$ y $5 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$ (Figura 13).

[122] Los datos obtenidos para los bloques B3 y B4 (Figura 14), ambos protegidos por tela de sombra, muestran que donde hay aplicación de los puntos de carbono la tasa fotosintética es menor que el tratamiento de control ($0 \text{ mg}^{\text{L}^{-1}}$). Sin embargo, hay un aumento de la eficiencia en el uso del agua (Figura 14).

[123] La diferencia entre los bloques sombreados y los no sombreados muestra que el comportamiento luminiscente de los puntos de carbono sólo se produce cuando es irradiado por una fuente de luz externa.

EJEMPLO 5: Efecto de los puntos de carbono en las tasas de fotosíntesis de la lechuga.

[124] También se muestra la influencia de los puntos de carbono en la fotosíntesis de la lechuga (*Lactuca sativa*) cultivada en sistema hidropónico. El cultivo hidropónico es una técnica de cultivo de hortalizas en la que se sustituye la tierra o el sustrato por una solución que contiene todos los nutrientes

esenciales para el desarrollo de las plantas.

[125] El sistema hidropónico permite que las plántulas se rieguen gradualmente con solución nutritiva desde la raíz, excluyendo así la aplicación por pulverización y el propio sistema hidropónico se utiliza como vehículo para la distribución de los puntos de carbono a los vegetales.

[126] Se utilizan tres bancos independientes, conectados a tres depósitos con soluciones hidropónicas independientes. Cada depósito tiene un volumen de 1000 litros de solución, que circulan periódicamente por el sistema. Para todos los depósitos se prepara una solución nutritiva de Hoagland modificada, esencial para el desarrollo del vegetal, donde se determinan tres concentraciones de puntos de carbono, 0 mg.L^{-1} ; 20 mg.L^{-1} y 50 mg.L^{-1} . La propia solución nutritiva se utiliza como vehículo de distribución de los puntos de carbono.

[127] Las plántulas se adquieren y pasan por un periodo de adaptación en el invernadero, donde se distribuyen por igual en los tres bancos y se riegan con la solución nutritiva previamente preparada. Los puntos de carbono se diluyen en los tanques y se ponen en circulación 21 días después de trasplantar las plántulas de lechuga.

[128] La recogida de datos se realiza para diez plántulas de lechuga de cada tratamiento. Las mediciones se realizan 15 días después del inicio de la aplicación de los puntos de carbono y las condiciones de lectura se conservan para todos los tratamientos. Una vez finalizados los análisis, se extraen los datos para la aplicación de las pruebas estadísticas como en el ejemplo 4.

[129] La figura 15 presenta los datos obtenidos por los IRGA. Se observa diferencia sólo en la eficiencia del uso del agua para el tratamiento más concentrado 50 mg.L^{-1} y el tratamiento de

control 0 mg.L⁻¹. Estas observaciones colaboran con el hecho de que la eficiencia fotosintética se logra cuando se realiza la aplicación foliar, pero que incluso sin promover cambios en la fotosíntesis los puntos de carbono pueden promover una mejor eficiencia en el uso del agua durante la fotosíntesis.

Ejemplo 6: Efecto de la Concentración de puntos de carbono en la raíz de las plántulas de maíz

[130] Las semillas de maíz se sonicán con una solución de NaClCt al 10% durante 10 minutos y se lavan con agua destilada cinco veces para su esterilización. A continuación, se colocan asépticamente en papel de germinación y se germinan en una cámara DBO en la oscuridad a 28°C. Después de dos días de germinación, las plántulas, con raíces de unos 1-1,5 cm, se transfieren a sistemas hidropónicos con macetas de plástico que contienen solución nutritiva *Hoagland* (25% de potencia) suplementada con 0 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹, 80 mg.L⁻¹ y 160 mg.L⁻¹ de puntos de carbono. Después de 5 días de crecimiento, las plantas (n = 9) se cosechan y se evalúa el peso seco de las raíces (RDW). Los resultados se analizan por regresión y se determina la concentración más eficaz de puntos de carbono.

[131] Para determinar la concentración más efectiva de puntos de carbono, se realiza un análisis de regresión y el modelo presentado fue el que mejor se ajustó a los datos. Los datos de la regresión siguen una distribución normal (Figura 16) .

[132] Se observa un modelo cuadrático significativo, con incrementos a baja concentración e inhibición gradual cuanto mayor es la concentración de puntos de carbono aplicada (Figura 16). La concentración más eficaz se estima en 100 mg.L⁻¹ de puntos de carbono, lo que resulta en un 75% más de RDM en comparación con el tratamiento de control.

Ejemplo 7: Efecto de los puntos de carbono en la tasa de fotosíntesis, el intercambio de gases en las hojas y el contenido de nutrientes en las plántulas de maíz.

[133] Una vez procesado el análisis de regresión con diferentes dosis de puntos de carbono, se muestra el efecto de los puntos de carbono contrastando sólo el control (0 mg.L^{-1}) y la dosis más efectiva observada (100 mg.L^{-1}) como se describe en el ejemplo 6.

[134] Las plántulas con raíces de aproximadamente 1 a 1,5 cm se transfieren a macetas Leonard (Figura 17) que contienen, en la parte superior, 0,5 kg de arena (0,5-0,84 mm) esterilizada con una solución de HCl al 10 %, seguida de un lavado con agua destilada hasta obtener una conductividad eléctrica $< 5 \mu\text{S.cm}^{-1}$. En el fondo de las macetas de Leonard se colocan $0,5 \text{ dm}^3$ de solución nutritiva de Hoagland (25% de fuerza) suplementada con 0 o 100 mg.L^{-1} de puntos de carbono. Las plántulas se trasplantan y semanalmente se sustituyen las soluciones por otras recién producidas pero aumentando la concentración al 50, 75 y 100% de fuerza.

[135] Después de 28 días de crecimiento, se miden los parámetros de intercambio de gases de las hojas, como la fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la transpiración, en las plantas ($n = 4$) utilizando un sistema de fotosíntesis de tipo IRGAs, con una cámara foliar estándar de 6 cm^2 . La eficiencia del uso del agua (WUE) se calcula como la relación entre la fotosíntesis neta y la transpiración. La concentración de CO_2 en la cámara de intercambio de gases se fija en $400 \text{ pmol.mol}^{-1}$ y las mediciones se realizan bajo una densidad de flujo fotosintético de $500 \text{ pmol .m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Las determinaciones se realizan entre las 9 y las 11 horas. La temperatura media durante todo el experimento

es de unos 28°C y la humedad relativa entre el 50 y el 60%.

[136] Para el análisis nutricional, las plantas se recogen y se tratan térmicamente a 65°C hasta alcanzar un peso constante y, a continuación, se moldean en polvo fino (tamiz de malla de 2 mm) utilizando un molino de cuchillas. En el material resultante se analiza el contenido de Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn y Ni tras la digestión de 0,5 g del compuesto con HNO₃ y HClO₄ a 180°C mediante espectroscopia de emisión atómica por plasma de microondas. El fósforo total se estima colorimétricamente a 660 nm tras la digestión del compuesto con H₂SO₄ y H₂O₂ por el método del ácido ascórbico/azul de molibdeno.

[137] El intercambio de gases de las hojas y el contenido de nutrientes se analizan mediante la prueba F de análisis de varianzas .

[138] La adición de puntos de carbono produce un aumento ($p < 0,05$) de la fotosíntesis neta (Figura 18a). Sin embargo, la conductancia estomática y la tasa de transpiración no se ven alteradas (Figura 18b y 18c, respectivamente).

[139] La eficiencia en el uso del agua (WUE) se ha buscado cada vez más en la agricultura de todo el mundo. En este sentido, el uso de estimulantes vegetales debe considerarse una herramienta importante, ya que estos estimulantes actúan como agentes modificadores de la arquitectura de las raíces e inducen procesos que afectan al metabolismo primario y secundario de las plantas. El WUE representa la capacidad de la planta para optimizar la absorción de carbono y minimizar la pérdida de agua, lo que supone una ventaja competitiva.

[140] Los puntos de carbono aumentan considerablemente el WUE en un 22% (Figura 18d). El aumento de este parámetro es típico de la adición de estimulantes vegetales y apunta a la capacidad de los puntos de carbono para modular el desarrollo de las raíces,

aumentando la capacidad de las plantas para absorber agua del suelo.

[141] El contenido de todos los nutrientes analizados está significativamente alterado debido a la presencia de puntos de carbono en la solución nutritiva (Figuras 19). Entre ellos, sólo se observan reducciones de Mg (8,7%) . El fósforo, el Ca y el Zn presentaron los menores incrementos, del orden del 7,8; 8,3 y 13,0%, respectivamente. Los contenidos de azufre y Ni muestran incrementos intermedios del 26,6 y 55,5%. Los aumentos más expresivos se observan para el Mn, el Cu y el Fe, cuyos contenidos se elevan en un 70,2; 82,1; 82,6%, respectivamente.

[142] Los datos nutricionales muestran que los puntos de carbono funcionan como potenciadores de la fotosíntesis y nanobioestimulantes, mejorando la absorción de algunos nutrientes.