



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

DESARROLLO DE UN NANO-FERTILIZANTE NITROGENADO Y SU EVALUACIÓN EN LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

MIGUEL ANGEL CRUZ HERNÁNDEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Miguel Angel Cruz Hernández, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Abel Quevedo Nolasco, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Desarrollo de un nanofertilizante nitrogenado y su evaluación en lechuga (Lactuca sativa)

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a _____ de julio de 2017



Firma del
Alumno (a)



Dr. Abel Quevedo Nolasco
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Desarrollo de un nano-fertilizante nitrogenado y su evaluación en lechuga (*Lactuca sativa* L.)** realizada por el alumno **Miguel Angel Cruz Hernández** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)



Dr. Abel Quevedo Nolasco

ASESOR



Dra. Libia Iris Trejo-Téllez

ASESOR



Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez

ASESOR



Dr. Fernando Carlos Gómez Merino

ASESOR



Dr. A. Enrique Becerril Román

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2018

Desarrollo de un nano-fertilizante nitrogenado y su evaluación en lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Miguel Angel Cruz Hernández, D.C.

Colegio de Postgraduados. 2017

RESUMEN

En la presente investigación se sintetizaron nanopartículas de alginato cargadas con urea, evaluando su aplicación como nanofertilizante fuente de nitrógeno en cultivo hidropónico de lechuga (*Lactuca sativa* L.). La síntesis de las nanopartículas se realizó mediante la técnica de secado por aspersión a escala nano, empleando glutaraldehído como agente entrecruzante. Las partículas generadas fueron caracterizadas mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y potencial zeta. Además, pruebas de liberación de N se realizaron in vitro, con la finalidad de evaluar el comportamiento de las partículas como sistemas de liberación controlada. Los resultados mostraron la obtención de nanopartículas esféricas, con tamaños promedio de 650nm y carga superficial de -39 ± 3 mV, la cual es un indicativo de buena estabilidad de las partículas al ser dispersadas en un medio acuoso. Por su parte, los estudios de EDS corroboraron la presencia y distribución homogénea de la urea (en forma de N) en la matriz polimérica, mientras que a través de FTIR y DSC, se comprobó el establecimiento de enlaces químicos entre alginato-alginato y alginato-urea producto de la incorporación de glutaraldehído. Las pruebas de liberación de nitrógeno indicaron que aproximadamente el 80% de la carga se liberó a las 72h de iniciado el experimento, por lo que se puede predecir que las partículas generadas pueden actuar como verdaderos sistemas de liberación controlada. En la segunda fase de la investigación se estableció un experimento con la finalidad de evaluar el efecto de las nanopartículas en parámetros de crecimiento, bioquímicos y nutrimentales en plantas de lechuga durante etapa vegetativa. Se establecieron 9 tratamientos los cuales se pueden agrupar en 3 grupos: a) tratamientos testigo, b) tratamientos con fertilizante convencional y c) tratamientos con nanofertilizante. El efecto de estos tratamientos fue evaluado en variables como longitud de hoja, longitud y volumen de raíz, número de hojas y área foliar, biomasa fresca, biomasa seca, fenoles totales en hoja y concentraciones y acumulaciones nutrimentales. Al finalizar el experimento (13d), en parámetros de crecimiento como diámetro de tallo, número de hojas, área foliar y biomasa fresca y seca, en hoja y raíz, se observaron efectos positivos en tratamientos con nanofertilizantes, siendo estadísticamente diferentes a los otros tratamientos. Con respecto los parámetros bioquímicos, el contenido de clorofila se vio favorecido por la aplicación de nanofertilizante, mientras que en el contenido fenólico total hubo una disminución en los valores al aumentar la concentración de N en todos los tratamientos donde dicho elemento estuvo presente. Finalmente, en relación a concentración y acumulación de macronutrientes en vástago se lograron observar mayores valores de N en tratamientos con nanofertilizante, mientras que para P, K, Ca y Mg se observaron efectos contrarios o sin diferencias entre tratamientos. Con respecto a la raíz, la concentración y acumulación de N y Ca fue significativamente mayor en tratamientos con nanofertilizante. A pesar del corto tiempo del experimento, los resultados obtenidos en esta investigación

son prometedores y crean una posibilidad real de que los materiales sintetizados puedan ser potencialmente utilizados como nanofertilizantes.

Palabras clave: nanofertilizante, urea, alginato de sodio, pruebas de liberación, concentración y acumulación nutrimental.

Development of a nitrogenous nano-fertilizer and its evaluation in lettuce

Miguel Angel Cruz Hernández, D. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

In the present research work, alginate nanoparticles loaded with urea were synthesized to evaluate their application as a nanofertilizer to supply nitrogen in hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). The synthesis of the nanoparticles was done through spray drying at a nano scale using glutaraldehyde as cross linking agent. The generated particles were characterized through scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and zeta potential. Also, N liberation tests were done in vitro in order to evaluate the behavior of the particles as controlled liberation systems. The results showed the obtainment of spherical nanoparticles, mean size 650 nm, and surface charge of -39 ± 3 mV, which indicates good stability of the particles when being dispersed in an aqueous medium. Meanwhile, the EDS studies corroborated the homogeneous presence and distribution of urea (as N) in the polymer matrix, and through FTIR and DSC, the chemical links between alginate-alginate and alginate-urea, product of the incorporation of glutaraldehyde, were proven. The nitrogen liberation tests indicated that approximately 80% of the load was released 72 h after the beginning of the experiment. Thus, we can predict that the generated particles can act as true controlled liberation systems. In the second stage of the research, an experiment was set up in order to evaluate the effect of the nanoparticles on growth, biochemical, and nutrient parameters of lettuce plants during their vegetative stage. Nine treatments were established, grouped into three groups: a) control treatments, b) conventional fertilizer treatments, and c) nanofertilizer treatments. The effect of these treatments was evaluated in variables like leaf length, root length and volume, number of leaves and leaf area, fresh biomass, dry biomass, total phenols in the leaves, and nutrient concentrations and accumulations. At the end of the experiment (13 d), positive effects were observed in the treatments with nanofertilizers in growth parameters like number of leaves, leaf area, and fresh and dry biomass of leaves and roots, all of them being statistically different from the other treatments. With regard to the biochemical parameters, chlorophyll content was favored by the application of the nanofertilizer, while there was a decrease in the the total phenol values as the N concentration increased in all the treatments where the element was present. Finally, with regard to macronutrient concentration and accumulation in the shoot, there were greater N values in the treatments with nanofertilizer, while in the case of P, K, Ca, and Mg, contrasting effects were observed, with no differences between treatments. With respect to the roots, the concentration and accumulations of N and Ca were significantly higher in the treatments with nanofertilizer. Despite the short run-time of the experiment, the results obtained in the present research work are promising and create a real possibility that the synthesized materials can be potentially used as agricultural nanofertilizers.

Key words: nanofertilizer, urea, sodium alginate, liberation tests, nutrient concentration and accumulation.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, mi gratitud eterna, tú me has ayudado a lo largo de mi vida y jamás me has olvidado, te estaré eternamente agradecido.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo otorgado para llevar a cabo mis estudios de Doctorado.

A la **Dr. Abel Nolasco Quevedo**, no tengo palabras para agradecerle por las aportaciones invaluable, su apoyo incondicional a lo largo de este recorrido y sobretodo su amistad.

A la **Dra. Libia I. Trejo-Téllez**, por el tiempo dedicado y su conocimiento aportado para cumplir esta meta, usted fue una guía en mis estudios, hago extenso mi más sincero agradecimiento.

Al **Dr. Miguel Ángel Aguilar Mendez** y la **Dra. Elba Ronquillo de Jesús**, mi profundo agradeciendo por acompañarme y creer en este proyecto de tesis, por abrir las puertas de su institución (IPN-CICATA Legaria), pero sobre todo por la aportación de su conocimiento, tiempo y amistad.

Al **Dr. Fernando Carlos Gómez Merino** por sus acertadas aportaciones y observaciones realizadas a la presente investigación.

Al **Dr. A. Enrique Becerril Román** por sus valiosas observaciones durante la realización de la investigación.

DEDICATORIA

A mis padres **Margarita** y **Efren**, gracias por darme la vida, porque supieron hacer de mi un hombre de bien, me enseñaron el significado del trabajo, el sentido de la honradez y la responsabilidad y que desde siempre me dieron la confianza y apoyo; mamá te agradezco infinitamente todas tus oraciones, los amo.

A mi hermano **Efren Cruz Hernández**, por el apoyo incondicional que me brindas, con afecto para ti.

A mis tios **Gloria**, **Silvano**, **Carlos[†]** y **Fernando** por su apoyo incondicional.

Sinceramente Miguel A. Cruz Hdez.

CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
LISTA DE CUADROS	XII
LISTA DE FIGURAS	XV
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 NITRÓGENO	1
1.2 UREA.....	1
1.3 NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA	3
1.3.1 <i>Desarrollo de nanociencia y nanotecnología</i>	5
1.4 NANOTECNOLOGÍA EN LA AGRICULTURA.....	8
1.5 USO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN FERTILIZANTES NITROGENADOS.....	9
1.5.1 <i>Nano-fertilizantes nitrogenados</i>	9
1.5.2 <i>Estudios de liberación controlada de nano-fertilizante (urea)</i>	15
1.5.3 <i>Procesos de absorción de nanopartículas en células vegetales</i>	19
LITERATURA CITADA	21
CAPÍTULO 2 FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANO-FERTILIZANTE COMO FUENTE DE N	26
2.1 INTRODUCCIÓN	26
2.2 METODOLOGÍA.....	28
2.2.1 <i>Sustancias químicas</i>	28
2.2.2 <i>Elaboración de las nanopartículas</i>	28
2.2.3 <i>Microscopia electrónica de barrido (SEM) y energía dispersiva de rayos X (EDS)</i>	29
2.2.4 <i>Potencial zeta</i>	29
2.2.5 <i>Calorimetría diferencial de barrido</i>	29

2.2.6	<i>Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)</i>	30
2.2.7	<i>Pruebas de liberación de nitrógeno</i>	30
2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
2.3.1	<i>Microscopia electrónica de barrido (SEM) y energía dispersiva de rayos X (EDS)</i>	30
2.3.2	<i>Potencial Zeta</i>	33
2.3.3	<i>Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)</i>	33
2.3.4	<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	35
2.3.5	<i>Liberación de N de las nanopartículas</i>	36
	CONCLUSIONES	37
	LITERATURA CITADA	39
CAPÍTULO 3	EVALUACIÓN DE UN NANO-FERTILIZANTE CON FUENTE DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE	
	LECHUGA (<i>LACTUCA SATIVA</i> L.)	42
3.1	INTRODUCCIÓN	42
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.2.1	<i>Ubicación del experimento</i>	44
3.2.2	<i>Material vegetal y condiciones del experimento</i>	44
3.2.3	<i>Tratamientos evaluados y diseño experimental</i>	46
3.2.4	<i>Variables evaluadas</i>	48
3.2.5	<i>Análisis estadístico</i>	50
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.3.1	<i>Variables fisiológicas</i>	51
3.3.2	<i>Número de hojas y área foliar</i>	56
3.3.3	<i>Biomasa fresca</i>	59
3.3.4	<i>Biomasa seca</i>	62
3.3.5	<i>Lecturas SPAD</i>	65
3.3.6	<i>Cuantificación de fenoles totales en hoja</i>	67

3.3.7	<i>Concentraciones de macronutrientos en vástago.</i>	69
3.3.8	<i>Acumulación de macronutrientos en vástago.</i>	75
3.3.9	<i>Concentraciones de macronutrientos en raíz.</i>	80
3.3.10	<i>Acumulación de macronutrientos en raíz.</i>	86
3.3.11	<i>Correlación Lectura SPAD y concentración de N en vástago.</i>	92
CONCLUSIONES.....		93
LITERATURA CITADA		94

LISTA DE CUADROS

Cuadro 3.1 Composición de solución nutritiva de Steiner al 25 % de su concentración (en mol _c m ⁻³).....	45
Cuadro 3.2 Tratamientos evaluados en lechuga cv. Starfighter.....	46
Cuadro 3.3 Longitudes de hoja y raíz, y volumen de raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 9 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.....	51
Cuadro 3.4 Longitudes de hoja y raíz y volumen de raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.....	52
Cuadro 3.5 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para de longitud de hoja, longitud de raíz y volumen de raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.....	56
Cuadro 3.6 Número de hojas y área foliar de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.....	57
Cuadro 3.7 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para de numero de hoja y área foliar de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes	

fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa. 58

Cuadro 3.8 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para biomasa fresca de hoja y raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa 61

Cuadro 3.9 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para biomasa seca de hoja y raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa. 64

Cuadro 3.10 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para lecturas SPAD en hoja de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa. 66

Cuadro 3.11 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para concentración de N en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa. 71

Cuadro 3.12 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para acumulación de N en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes

fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa. 76

Cuadro 3.13 Probabilidad de error (significancia) según contraste para concentración de N en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa. 80

Cuadro 3.14 Probabilidad de error (significancia) según contraste para acumulación de N en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa. 86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Porcentaje de publicaciones de artículos indexados ISI a nivel mundial relacionados con nanociencias y nanotecnologías.	6
Figura 2.1 Nanopartículas de alginato cargadas con urea: a) Micrografía de SEM que muestran tamaño y forma, b) histograma de distribución de tamaño y c) Espectro de EDS indicando la composición elemental de las nanopartículas.	32
Figura 2.2 Mapeo de a) Micrografía de SEM que muestran tamaño y forma y b) Micrografía de EDS que muestra la distribución uniforme de nitrógeno en la red polimérica.	32
Figura 2.3 Espectros de FTIR de los precursores empleados (alginato y urea) y de las nanopartículas de alginato con urea (Nanourea) y sin urea (Nanoblanco)	34
Figura 2.4 Termogramas de DSC mostrando las transiciones de fase ocurridas durante el proceso de calentamiento de la urea, nanopartículas sin urea (NP Alg) y nanopartículas con urea (NP Alg-Urea).	36
Figura 2.5 Liberación de nitrógeno de las nanopartículas.	37
Figura 3.1 Distribución de tratamientos.	48
Figura 3.2 Daño foliar en planta de lechuga cv. Starfighter a los 13 días en los tratamientos nanofertilizante-urea al 25%, nanofertilizante-urea al 50%, nanofertilizante-urea al 25% con enzima y nanofertilizante-urea al 50% con enzima.	54

Figura 3.3 Biomasa fresca de hoja y raíz en planta de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ ;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima..... 60

Figura 3.4 Biomasa seca de hoja y raíz en planta de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ ;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima..... 63

Figura 3.5 Lecturas SPAD en hojas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:**

AD. agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ** ; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima..... 65

Figura 3.6 Contenido de fenoles totales en hojas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; n=9) entre tratamientos.

Tratamientos: **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ** ; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima..... 68

Figura 3.7 Micrografías de Microscopia Electrónica de Barrido. A) corte transversal de nervadura de la hoja de lechuga, B, C y D) nano partículas cargadas de urea en la parte interna de la nervadura. 70

Figura 3.8 Concentración de macronutrientes de N, P y K en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; n=9) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas

de alginato sin carga de urea. **NPAε**; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%**. urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%**. nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%**. nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%ε**. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%ε**. nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 72

Figura 3.9 Concentración de macronutrientos de Ca y Mg en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias ± DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; n=9) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD**. agua destilada; **NPA**. nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAε**; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%**. urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%**. nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%**. nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%ε**. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%ε**. nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 74

Figura 3.10 Acumulación de macronutrientos de N, P y K en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias ± DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; n=9) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD**. agua destilada; **NPA**. nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAε**; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%**. urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%**. nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%**. nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%ε**. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%ε**. nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 77

Figura 3.11 Acumulación de macronutrientos de Ca y Mg en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ .** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 79

Figura 3.12 Micrografías de Microscopia Electrónica de Barrido. A) corte transversal de raíz de lechuga, B, C y D) nano partículas cargadas de urea en la parte interna de la raíz. 81

Figura 3.13 Concentración de macronutrientos de N, P y K en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ .** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 83

Figura 3.14 Concentración de macronutrientos de Ca y Mg en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ .** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 85

Figura 3.15 Acumulación de macronutrientos de N, P y K en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ .** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 90

Figura 3.16 Acumulación de macronutrientos de Ca y Mg en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$;

n=9) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ** ; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima. 91

Figura 3.17 Correlación de lectura SPAD en hojas de lechugas y concentración de N en vástago de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Starfighter a los 13 días de tratamiento. 92

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1 NITRÓGENO

Después del carbono, el nitrógeno (N) es el elemento que se requiere en mayores cantidades por las plantas: aproximadamente entre el 1 y 5% de la materia seca total de la planta es N, que es un componente integral de las proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, co-enzimas, fitohormonas y metabolitos secundarios. La disponibilidad de N, es un factor decisivo para el crecimiento vegetal ([Marschner, 2011](#)).

Los fertilizantes nitrogenados juegan un papel fundamental para la mejora de la producción agrícola, pero la eficiencia en el uso de nutrientes es aún muy baja, debido a procesos de pérdidas de N hacia el ambiente desde el sistema de producción, tales como la lixiviación, la denitrificación, la volatilización, la inmovilización microbiana, la fijación y la escorrentía. En general, entre el 40 y 70% de nitrógeno que se aplica se pierde y no se puede absorber por las plantas, lo que provoca no sólo las grandes pérdidas económicas y de recursos, sino también una muy grave contaminación del medio ambiente ([Solanki *et al.*, 2015](#)).

1.2 UREA

La urea [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] es una fuente rica de nitrógeno (46% en peso) y por tanto es un fertilizante de uso común ([Kottegoda *et al.*, 2017](#)). Sin embargo, la pérdida del N de la urea agregada al suelo se produce por la acción del agua, la actividad de la enzima ureasa y la volatilización del amoníaco antes de que se pueda absorber eficientemente

por las plantas. Éste es un gran desafío para la agricultura mundial y amenaza la seguridad alimentaria en el futuro (Morris, 2002).

La urea en suelos es hidrolizada por la ureasa, una enzima níquel-dependiente producida por los microorganismos del suelo a amonio NH_4^+ , misma que puede ser convertida a nitrato (NO_3^-) vía nitrificación. Por tanto, la fertilización con urea expone a la raíz simultáneamente a urea, amonio y nitrato, al menos durante períodos cortos de tiempo (Merigout *et al.*, 2008).

La urea puede servir como única fuente de nitrógeno para el crecimiento de las plantas. Esto se demostró en el laboratorio, evitando cualquier conversión de nitrógeno no vegetal como la hidrólisis de urea microbiana o la nitrificación. Sin embargo, la nutrición nitrogenada, con base en urea conduce a un crecimiento reducido y en algunos casos a síntomas de deficiencia de nitrógeno en comparación con la nutrición nitrogenada con nitrato o nitrato de amonio (Merigout *et al.*, 2008). Las razones moleculares para el uso ineficiente de la urea como única fuente de nitrógeno por las plantas no se entienden, pero hipótesis como la alteración de la homeostasis osmótica (Gerendas y Sattelmacher, 1997) o el uso ineficaz de nitrógeno dentro de la planta. Cuando las plantas crecen exclusivamente con urea, las concentraciones de los aminoácidos de almacenamiento y transporte de nitrógeno, en particular la glutamina, pero a menudo la asparagina, aumentan, lo que da lugar a mayores concentraciones de aminoácidos totales (Merigout *et al.*, 2008; Gerendas y Sattelmacher, 1997). Estos altos niveles de aminoácidos amídicos pueden contribuir a la depresión del crecimiento, tal vez porque estos

aminoácidos indican la abundancia de nitrógeno a la planta, lo que resulta en una disminución en la absorción y distribución de nitrógeno.

En algas, el uso de urea marcada con ^{14}C demostró la captación de moléculas de urea por dos sistemas de transportadores, que operan a bajas y altas concentraciones de urea (sistemas de transportadores de urea de alta y baja afinidad). Este sistema de transporte es diferente de la captación pasiva y los mecanismos de transporte de tipo difusión, que están mediados por proteínas transmembrana.

1.3 NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA

La nanociencia y la nanotecnología comprenden el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales por medio del control del material en la nanoescala, así como la explotación de fenómenos y propiedades del material. La nanotecnología es una disciplina que aparece en la segunda mitad del siglo XX, cuando Richard P. Feynman en 1960 se refirió a las posibilidades que ofrece la manipulación de materiales a escala atómica (Muñoz *et al.*, 2017). Las aplicaciones pueden ser diversas, como ejemplo algunos materiales nanoestructurados se utilizan en artículos de lujo tales como pelotas de golf; en la fabricación de llantas de alto rendimiento y resistencia; tejidos antimanchas, antiolores y antiarrugas; en cosmética; en filtros y membranas para la purificación del agua, tratamiento de aguas residuales, remediación ambiental, procesamiento y envasado de alimentos, industrial, artículos domésticos, medicina, desarrollo de sensores inteligentes, en la mejora de los procesos de producción mediante la introducción de materiales más resistentes o en el diseño de nuevos materiales (Delgado, 2014).

La población mundial se estima en 7.6 mil millones para el año 2020, el crecimiento de la población está enfrentando amenazas debido al cambio climático, lo cual afecta la eficiencia en la producción de alimentos, ante esto retos es importante el manejo eficiente de la producción, procesamiento y abasto de alimentos. Como en otros sectores, la nanotecnología promete revolucionar el desarrollo de productos y aplicaciones en la agricultura y procesamiento de alimentos. La investigación de la nanociencia y nanotecnología en la agricultura aún se encuentra en su fase experimental, pero son prometedora, las áreas en las cuales se han desarrollado investigaciones son: reguladores de crecimiento, fertilizantes y elementos benéficos, control de plagas y enfermedades, bioremediadores de suelo, sensores, por mencionar algunos. En el procesamiento de alimentos existen la aplicación de nanotecnología en empaques, aditivos de conservación, películas comestibles, enriquecimiento de nutrientes funcionales (antioxidantes, vitaminas y minerales), entre algunas aplicaciones (Helal, 2013; Misra *et al.*, 2013 y Fraceto *et al.*, 2016).

Países en desarrollo enfrentan escasez de alimentos, mientras que los países desarrollados, existe un excedente de alimentos. Para ambos sistemas es prioritario desarrollar cultivos resistentes a las plagas y la sequía y maximizar el rendimiento. La industria agroalimentaria en los países desarrollados es impulsada por la demanda de los consumidores de alimentos frescos y saludables. La nanotecnología tiene el potencial de revolucionar los sectores agrícola y alimentario, la ingeniería ambiental, la protección y la seguridad de los recursos hídricos, la conversión de la energía, y en muchas otras áreas. La aplicación de la nanotecnología en la agricultura y la industria alimentaria fue abordada por primera vez por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en

2003. La inversión mundial en el campo de la nanotecnología ha ido aumentando y alcanzado unos \$10 mil millones en 2005, y se estima que el volumen anual de la producción de nanopartículas más allá de \$1 billón en 2015 (Misra *et al.*, 2013 y Tripathi *et al.*, 2017).

1.3.1 Desarrollo de nanociencia y nanotecnología

Se espera que la nanotecnología impacte en el desarrollo científico y económico en el futuro. Con el fin de seguir siendo competitivos, más de 60 países han adoptado proyectos o programas nacionales para impulsar la investigación en esta rama (Dang *et al.*, 2010). Las patentes son uno de los indicadores, que más se utilizan para medir la innovación de los productos (Foladori *et al.*, 2016). Analistas calculan que las patentes de nanotecnologías se han disparado a nivel mundial, pasando de 2 000 a principios de siglo a más de 20 000 en 2012 (Jordan *et al.*, 2014). Las oficinas de patentes de los Estados Unidos (EE.UU.), la República Popular China, Japón, y Corea del Sur han publicado el mayor número de solicitudes de patentes de nanotecnología; mientras que México, Brasil, y Ucrania para el año 2000, no tenían solicitudes de patentes (Dang *et al.*, 2010).

Por otro lado, la base de datos Science menciona que, de 1,452,020 artículos indexados, el 9% se relaciona con el tema de la nanociencia y nanotecnología, en 2016.

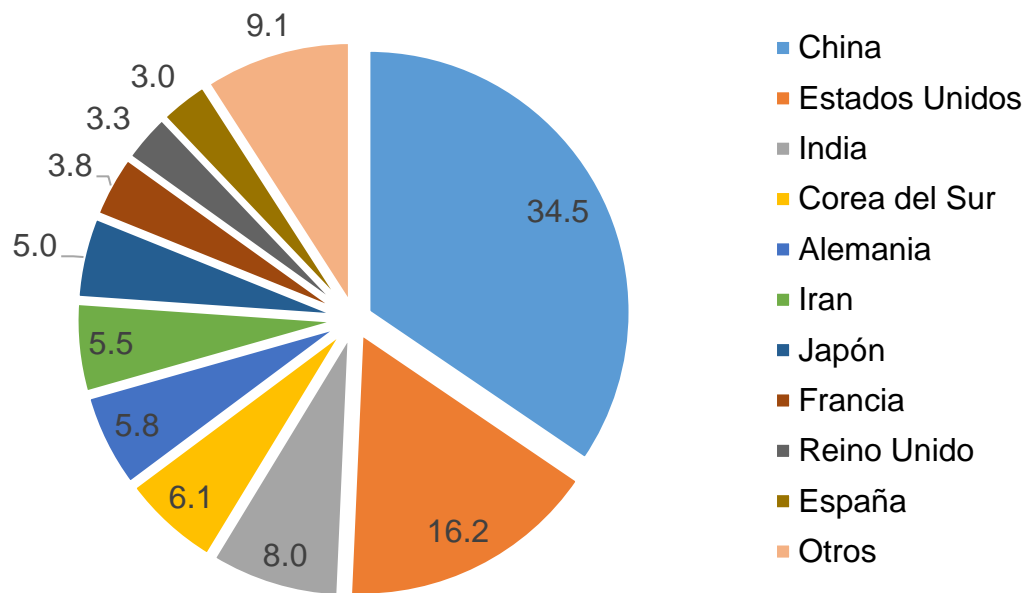


Figura 1.1 Porcentaje de publicaciones de artículos indexados ISI a nivel mundial relacionados con nanociencias y nanotecnologías.

Fuente: Elaboración propia con datos de StatNano, 2016 (<http://statnano.com>).

China se posiciona en el primer lugar en la publicación de artículos indexados ISI con cerca de un tercio (32.3%) del total de los artículos publicados a nivel mundial. Mientras los investigadores de Estados Unidos e India ocupan el segundo y tercer lugar, con 17.3% y 7.3%, respectivamente. En la **Figura 1** se muestran los 10 países con mayor producción de artículos indexados ISI que se relacionan con nanociencias y nanotecnologías (<http://statnano.com/report/s29>).

Brasil, México y Argentina son los países, de América Latina, más avanzados en el desarrollo de nanotecnología (Foladori *et al.*, 2012). México se ubica en el lugar 28 con 0.85% de publicaciones en temas de nanotecnología (NT) a nivel mundial (<http://statnano.com/report/s29>, 2016). Tiene más de 50 universidades y centros públicos

de investigación de NT. Entre los más relevantes está la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que cuenta con más de una docena de departamentos e institutos en la Ciudad de México y otras universidades del país donde se está haciendo NT. Sumando todos los investigadores en NT en el país, la UNAM cuenta con aproximadamente una quinta parte de ellos. Otra gran universidad pública es la UAM (Universidad Autónoma Metropolitana) en el Área Metropolitana de la Ciudad de México. Dos de los tres campus cuentan con laboratorios en NT. El campus de Iztapalapa (UAM-I) es la sede del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear desde 1995, actualizado significativamente en 2006 y 2009; el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular (desde 2004). Un tercer gran centro público de investigación, de alcance nacional, es el Instituto Politécnico Nacional (IPN). Su centro de investigación CINVESTAV construyó, en 2005, el LANGEBIO (Laboratorio Nacional en Genómica para la Biodiversidad) en el campus de Guanajuato, y en 2009, el Centro de Nanociencias de Micro y Nanotecnología en el campus de Querétaro y Ciudad de México. Otros campus del IPN cuentan con laboratorios especializados, como el de semiconductores en Guadalajara (CTS-Centro de Tecnología de Semiconductores) y en Ingeniería Electrónica en Zacatenco, Ciudad de México. Otros dos Centros de Investigación CONACYT ganaron una convocatoria para laboratorios nacionales en 2006, por lo que el CIMAV en Chihuahua creó el NaNoTeCH (Laboratorio Nacional de Nanotecnología), mientras que el IPICyT en San Luis Potosí creó el LINAN (Laboratorio Nacional de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología); ambos destinados a cubrir las demandas nacionales. Sin embargo, otros centros públicos cuentan con laboratorios importantes, como el del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE)

en Puebla, que abrió sus puertas en 2001 y ha ido actualizando su laboratorio en los últimos años hasta el recientemente creado Laboratorio para la Innovación en Nanotecnología (Foladori *et al.*, 2012).

Será de vital importancia, en futuras investigaciones, centrarse en cuatro aspectos distintos de la nanotecnología: 1) Progreso del conocimiento, cómo la ciencia y la ingeniería a nanoescala puede mejorar la comprensión de la naturaleza, proteger la vida, generar grandes descubrimientos, innovación, predecir la conducta de la materia, y diseñar materiales y sistemas a nanoescala; 2) Progreso material, cómo la nanotecnología puede generar soluciones médicas y de valor económico; 3) Progreso global, cómo la nanotecnología puede promover la seguridad en la sociedad y genere desarrollo sostenible mediante colaboración internacional y 4) Progreso moral, responsabilidad en el uso de la nanotecnología para mejorar la calidad de vida y la equidad social (Roco *et al.*, 2011).

1.4 NANOTECNOLOGÍA EN LA AGRICULTURA

La producción sostenible es un concepto que se refiere a un sistema con el objetivo de aumentar el rendimiento sin impacto ambiental. Este paradigma proporciona un marco para evaluar la selección de la mejor combinación de enfoques para la producción agrícola considerando la influencia de la corriente biofísicos, sociales, culturales, y de la situación económica. La síntesis de nanopartículas basadas en materiales inorgánico, polímeros y lípidos, sintetizadas por diversas técnicas (emulsificación, gelación iónica, polimerización, oxido reducción, por mencionar algunas) han sido desarrollados para aumentar la productividad. Las aplicaciones potenciales de la nanotecnología en la

agricultura se pueden dividir en 4 áreas que a continuación se mencionan: a) aumentar la productividad usando nano-fertilizantes y nanopesticidas y; b) mejorar la calidad del suelo usando nanozeolitas e hidrogeles; c) estimular el crecimiento de las plantas utilizando nanomateriales (SiO_2 , TiO y nanotubos de carbono); d) proporcionar supervisión inteligente mediante nanosensores por dispositivos de comunicación inalámbrica (Fraceto *et al.*, 2016).

Se pueden encontrar aplicaciones, por ejemplo, para el desarrollo de nanosistemas inteligentes para la inmovilización de nutrientes en el suelo o su liberación controlada. Estos sistemas tienen la ventaja de minimizar la lixiviación, mientras se mejora la absorción de nutrientes por las plantas, también para mitigar la eutrofización, reduciendo la movilización de nitrógeno a las aguas subterráneas (Liu y Lal, 2015). Los nanomateriales podrían aprovecharse para mejorar la estructura y función de los plaguicidas y fungicidas, mejorando la solubilidad, resistencia a la hidrólisis y fotodescomposición, el diseño proporcionaría un liberación controlada y específica hacia organismos en cuestión. (Mishra and Singh, 2015; Grillo *et al.*, 2016; Nuruzzaman *et al.*, 2016).

1.5 USO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN FERTILIZANTES NITROGENADOS

1.5.1 Nano-fertilizantes nitrogenados

La nanotecnología puede revolucionar la industria de los fertilizantes, diseñando y sintetizando un “nano-fertilizante inteligente” (Kanjana, 2015). A medida que se desarrollan nuevas investigaciones en nanotecnología, los resultados muestran un

impacto significativo sobre la liberación controlada, dentro de la sostenibilidad, que se enfrentan las economías emergentes. Además, es viable que la mayoría de los nanomateriales contenidos productos que lleguen al mercado cumplan los estándares de eficacia y seguridad, asegurando la validación que la evaluación de toxicidad y las auditorías de impacto ambiental (Karunaratne *et al.*, 2012). Aunque la liberación lenta de sustancias químicas ha sido ampliamente aplicada para la administración de fármacos, poco se ha hecho sobre el uso de este principio, con base en la nanotecnología para suministrar nutrientes a los cultivos (Kottegoda *et al.*, 2017).

Los nano-fertilizantes se sintetizan para fortificar nutrientes solos o en combinaciones sobre los adsorbentes con nano-dimensión. Tanto el enfoque físico y químicos se utilizan en la síntesis de nanomateriales, son cargados con nutrientes catiónicos (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) y después de la modificación superficial para nutrientes aniónicos (NO_3^- , PO_4^{2-} , SO_4^{2-}). Se sabe que los nano-fertilizantes liberan nutrientes de forma lenta y constante durante más de 30 días, lo que puede ayudar a mejorar la eficiencia del uso de nutrientes sin ningún efecto adverso asociado (Subramanian y Thirunavukkarasu, 2017). Los trabajos realizado con nano-fertilizantes son muy limitados en todo el mundo, pero la literatura indica que estos fertilizantes tienen un papel potencial en el mantenimiento de la productividad agrícola. El uso de fertilizantes de liberación controlada (FLC) se ha convertido en una nueva tendencia para minimizar la contaminación ambiental (Roshanravan *et al.*, 2015).

Debido a sus características poliméricas catiónicas, biodegradables, bioabsorbibles y bactericidas, el quitosano es un material interesante para su uso en sistemas de

liberación controlada. Se han reportado nanopartículas de quitosano con la polimerización de ácido metacrílico para la incorporación de fertilizantes NPK. Los resultados de espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) indicaron la existencia de interacciones electrostáticas entre las nanopartículas de quitosano y los elementos N, P y K. La estabilidad de la suspensión coloidal de nanopartículas de quitosano-ácido metacrílico fue mayor con la adición de nitrógeno y potasio que con la adición de fósforo debido a la carga aniónica más alta del fosfato cálcico que las cargas aniónicas del cloruro potásico y la urea (Corradini *et al.*, 2010).

Sarkar *et al.* (2014) usaron compuestos de polímero/nanoarcilla [seis tipos diferentes de nanoarcillas, (caolinita, mica y esmectita con y sin aluminosilicato amorfo)], encontraron que hay una liberación más rápida de los compuestos poliméricos puros (sin arcilla) en comparación con los compuestos de polímero/nanoarcilla. En el caso del polímero puro, la cantidad total de N se liberó dentro de las 15 h de incubación. La liberación de N de los materiales compuestos de polímero/nanoarcilla cargados de urea fue similar en las tendencias de la conducta de liberación de nutrientes. Inicialmente (hasta 15 h), la tasa de liberación fue alta, y luego la tasa disminuyó gradualmente. La presencia de aluminosilicatos amorfos en arcilla no hizo ninguna diferencia en la velocidad de liberación de nutrientes.

Wang *et al.* 2010 realizaron un estudio en arroz suministrando urea convencional y nano-urea (urea cubierta con nanomateriales) en tasas de N de 0, 90, 135, 180, 225 y 270 kg ha⁻¹ para investigar los efectos de nano-urea sobre el rendimiento del arroz y la eficiencia agronómica de fertilizantes de nitrógeno (EAN). Con una tasa de N de 0-90 kg ha⁻¹, no

se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de fertilizantes de urea en el rendimiento de grano y EAN. Sin embargo, con dosis más altas de N, el número de macollos, valores SPAD y acumulación de materia seca de las plantas fueron significativamente mayores en los tratamientos con nano-urea que en tratamientos de urea convencional. El mayor incremento en el rendimiento de grano y EAN fue 10.2% y 44.5%, respectivamente.

Abdel et al. (2016) investigaron el efecto de nanopartículas de quitosano cargadas con nitrógeno, fósforo y potasio (NPK) en plantas de trigo mediante absorción foliar. La absorción y translocación de las nanopartículas dentro de las plantas de trigo se investigó por microscopía electrónica de transmisión. Los resultados revelaron que las nanopartículas ingresaron en la planta y se transportaron a través de los tejidos del floema. El tratamiento de las plantas de trigo cultivadas en suelo arenoso con fertilizantes nano quitosano-NPK mostró aumentos significativos en el índice de cosecha y de las variables de rendimiento de trigo, en comparación con variables de rendimiento de plantas testigo de trigo tratados sin fertilización y fertilización con NPK convencional. El ciclo de vida de las plantas de trigo tratadas con nano-fertilizante fue más corto que las plantas de trigo fertilizadas con NPK convencional, con la proporción de 23.5% (130 días en comparación con 170 días para la producción a partir de la fecha de siembra).

El grafeno es un material de carbono ultra-delgado con alta resistencia mecánica, excelente conductividad y una alta área superficial (*Stankovich et al., 2006*). *Zhang et al. (2014)* desarrollaron un fertilizante de liberación lenta de gránulos encapsulando KNO_3 con películas de óxido de grafeno (OG). El material se sometió a un tratamiento térmico,

donde las láminas de óxido de grafeno adyacentes se sellaron y se redujeron a hojas de óxido de grafeno reducidas (re-OG) por potasio. Después del sellado se formaron gránulos de KNO_3 , las características del fertilizante de lenta liberación mejoraron. El proceso de liberación del fertilizante se prolongó hasta por 8 h en agua.

Los efectos del grafeno en raíz, brote de crecimiento, biomasa, forma, muerte celular, y especies reactivas de oxígeno (ROS) en plántulas de col, tomate, espinaca, y lechuga, se investigaron dentro del intervalo de concentración de 500 a 2.000 mg L^{-1} . Los resultados de los análisis morfológicos y fisiológicos combinados indicaron que después de 20 días de exposición bajo las condiciones experimentales, el grafeno inhibió significativamente el crecimiento de plantas y la biomasa en comparación con un control. El número y tamaño de las hojas de las plantas tratadas con grafeno se redujeron, de forma proporcional a la dosis. Se detectaron efectos estadísticamente significativos, también un aumento dependiente de la concentración en ROS y muerte celular, así como síntomas visibles de lesiones necróticas, lo que indica efectos adversos de grafeno inducida sobre plántulas de col, tomate y espinaca mediada por necrosis y estrés oxidativo. Poco o ningún efecto tóxico significativo se observó con plántulas de lechuga en las mismas condiciones. El efecto potencial del grafeno depende en gran medida de la dosis, el tiempo de exposición, y las especies de plantas (Begum *et al.*, 2011).

Se llevó a cabo un experimento para evaluar los efectos de nano-urea en plantas de arroz híbrido. Los parámetros que se evaluaron fueron la concentración de nitrógeno, pérdidas por lixiviación, rendimiento del grano y uso eficiente de nitrógeno, la urea convencional se usó como control. La pérdida de N en el tratamiento de nano-urea fue

menor en comparación al tratamiento con urea común, la cual tuvo pérdidas del 70.6% - 74.3%. El rendimiento de grano de arroz y la eficiencia agronómica de N del tratamiento con nano-urea fueron superiores en comparación al tratamiento con urea. (Wang *et al.*, 2011).

Los nanocompuestos de montmorillonita-urea presentan un buen potencial para usos prácticos, ya que se componen de pequeños gránulos, siendo por tanto adecuados para su aplicación como material sólido sobre el suelo. Sin embargo, estos nanocompuestos nitrogenados presentan baja resistencia mecánica y relación poco comprendida entre el contenido de arcilla y el comportamiento final de liberación de nitrógeno, lo que ha motivado a seguir investigación para obtener fertilizantes de lenta liberación con mejores desempeños (Yamamoto *et al.*, 2016). Nanocompuestos de montmorillonita-urea tienen un patrón de liberación lenta para la disolución de urea. El tipo de montmorillonita, en una relación 1:20 montmorillonita-urea, posee una eficiencia ecológica y económica deseable en la producción de fertilizante de urea de liberación lenta debido a la aplicación de la arcilla impura y natural, que es de muy bajo costo y ecológica. Sin embargo, la urea se intercala completamente en la capa intermedia de arcilla por una técnica simple y con un buen comportamiento de liberación lenta (Golbashy *et al.*, 2016). La formación del polímero urea-formaldehído a partir de paraformaldehído en presencia de montmorillonita es un método eficaz para obtener gránulos de fertilizante por extrusión. Se ha encontrado que la relación molar de 1:0.5 urea/paraformaldehído intermedia resulta en las tasas más eficientes de liberación de nitrógeno en las pruebas de incubación del suelo. Estos resultados confirman los supuestos iniciales de esta

investigación y crean una posibilidad real de fabricar materiales inteligentes para la fertilización del suelo (Yamamoto *et al.*, 2016).

1.5.2 Estudios de liberación controlada de nano-fertilizante (urea)

Roshanravana *et al.* (2014) emplearon caolinita intercalada con urea conteniendo 20% en peso de urea granulada y recubierta con resina epóxica con base de agua para preparar un fertilizante de liberación controlada de nitrógeno. Los resultados de los experimentos de liberación revelaron que la intercalación de urea en caolinita causó una disminución de tres veces en la tasa de liberación de nitrógeno en comparación con la muestra no intercalada. Además, al aumentar el tamaño de los gránulos y el grosor del revestimiento, la tasa de liberación de nitrógeno del fertilizante disminuyó. Los ensayos de aglomeración con quitosano (para preparar gránulos de urea-caolinita) revelaron que aproximadamente 6% es la concentración óptima para producir gránulos con la resistencia más alta. Las pruebas de volatilización de amoníaco revelaron que el fertilizante de lenta liberación fue capaz de reducir las pérdidas de nitrógeno en comparación con los gránulos de urea convencionales en aproximadamente 12%. Roshanravan *et al.* (2015), demostraron la viabilidad de usar quitosano como el aglutinante para preparar gránulos de fertilizante de lenta liberación urea-caolinita.

Las partículas de hidroxiapatita modificada con urea han sido empleadas en la agricultura, debido a su mayor uso eficiente del nitrógeno y liberación lenta al suelo. Estas maximizan la utilización eficiente del nitrógeno por las plantas y minimizan los efectos adversos para el medio ambiente. La molécula de hidroxiapatita en polvo en diferentes concentraciones (10%, 20%, 30% y 40%) y fueron mezcladas con una molécula de nano-

urea usando ultrasonido. Se aplicó una molécula de compuesto modificado con urea en *Vigna radiata* en campo, así como semilla tratada y directamente aplicada al suelo. La partícula de hidroxiapatita modificada con urea tuvo el pH más alto (7.81) comparado con el de la urea normal. La semilla tratada con partículas de hidroxiapatita mostró una germinación del 100%, similar al tratamiento con agua destilada, mientras que la urea por sí sola da sólo el 70% de la germinación de la semilla (Subbaiya *et al.*, 2011). La funcionalización de nanopartículas de hidroxiapatita con urea conduce a un nanofertilizante funcional. La urea puede interactuar con nanopartículas de hidroxiapatita por grupos de amina y carbonilo, esto permite una liberación lenta de nitrógeno. Nanohíbridos de urea-hidroxiapatita presentan una liberación lenta de N con relación a urea pura. Estudios de liberación en un medio acuoso muestran que la liberación lenta puede ocurrir hasta por una semana en los nanohíbridos de urea- nanopartículas de hidroxiapatita, en contraste con la urea pura que se consume en pocos minutos. Además, las propiedades de liberación lenta se correlacionan con un mejor rendimiento del cultivo de arroz a una concentración de urea 50% menor (Kottegoda *et al.*, 2017).

Xiaoyu *et al.* (2013) produjeron una urea de lenta liberación (LL), utilizando bentonita (material barato y seguro como sustrato principal) y un polímero orgánico para formar una estructura de red tridimensional mediante la fusión directa de urea. La estructura afectó a la recristalización de urea y aumentó su densidad de apilamiento. El área superficial específica de la urea-LL fue $0.046 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, mucho menor que la de la urea común ($1.698 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). El experimento de liberación demostró que el 75% de la muestra de 12 g de urea-LL se liberó en 1 L de agua durante 14 h, mucho más largo que el de la urea común (<0.5 h).

Un nanocompuesto de *Gliricidia sepium* encapsulado con nanopartículas de hidroxiapatita modificadas con urea mostró una liberación lenta y sostenida de nitrógeno a lo largo del tiempo a tres valores de pH diferentes (pH 4.2, 5.2 y 7.0). La composición de fertilizante propuesta puede maximizar el uso eficiente de nitrógeno al tiempo que minimiza los efectos adversos para el medio ambiente debido al uso de grandes cantidades de fertilizantes en la agricultura (Kottegoda *et al.*, 2011).

Wanyika *et al.* (2012) sintetizaron nanopartículas de sílice mesoporoso a través del método de plantillas de cristal líquido, las cuales tuvieron diámetros de partícula de ~150 nm y tamaños de poro ~2.5 nm. Los resultados de los estudios de liberación en suelo revelaron mejoría (5 veces más) en el período de liberación. Por la capacidad de atrapar moléculas de urea en sus mesoporos y liberarlos de forma controlada, nanopartículas de sílice con materiales mesoporosos demostraron su gran potencial como nanotransportadores para agroquímicos.

Manikandan y Subramanian (2014) realizaron un estudio de laboratorio para mejorar la eficiencia de uso de nitrógeno de urea utilizando zeolita natural microporosa y zeolita nanoporosa como sustrato. Los datos revelaron que la liberación de N de la urea mezclada con zeolita nanoporosa 1:1 (p/p) fue de hasta 48 días, mientras que la mezcla convencional de zeolita natural microporosa-urea 1:1 (p/p) fue hasta 34 días y la liberación de total de N como urea se realizó en un plazo de 4 días bajo condiciones ambientales. La clinoptilolita es la zeolita natural más abundante en la naturaleza, posee una alta capacidad de intercambio catiónico y una gran afinidad por los iones NH_4^+ . La utilización de la clinoptilolita- NH_4 produce un aumento de rendimiento en diferentes dosis

de nitrógeno y produce un aumento en la eficiencia de recuperación del nitrógeno del fertilizante al emplear dosis de 120 y 180 kg·ha⁻¹ de nitrógeno. La utilización de clinoptilolita-urea presenta menores rendimientos, respecto de los tratamientos fertilizados con urea solo en la dosis menor (Millán *et al.*, 2008).

Zareabyaneh y Bayatvarkeshi (2015) mostraron que fertilizantes quelatados con nano-nitrógeno, quelatados con nano-nitrógeno revestido con azufre y urea revestida de azufre condujeron a una reducción de los niveles de lixiviación de nitrato en 35.72, 41.56 y 9.94% respectivamente, en comparación con la aplicación de fertilizantes con urea convencional. El rendimiento de la papa aumentó en 56.10, 59.61 y 49.76% con los fertilizantes quelatados con nano-nitrógeno, quelatados con nano-nitrógeno revestido con azufre y urea revestida de azufre, respectivamente, en comparación con la aplicación de fertilizantes con urea. La carga de enzimas ureasa o inhibidores de la ureasa en los poros expandidos de PE- MCM-41 resulta en una técnica para controlar la liberación de nitrógeno de la urea a través de la hidrólisis enzimática (Hossain *et al.*, 2008).

Shamsudin *et al.* (2014) investigaron el efecto del tamaño de partículas sobre las propiedades de compactación y las características de comprimidos de urea fabricadas a partir de gránulos de urea y polvo de urea molida. Usaron cinco presiones aplicadas que oscilaban entre 37.67 MPa y 188.35 MPa. Los resultados demostraron que los comprimidos de gránulos de urea liberan menor cantidad de ion amonio en comparación con tabletas de polvo de urea molida en casi todas las presiones aplicadas, excepto a 75.34 MPa.

1.5.3 Procesos de absorción de nanopartículas en células vegetales

Algunos artículos mencionan lo que sucede en la absorción de nanopartículas (NPs) por las plantas, donde, las nanopartículas primero atravesarían la epidermis de la raíz donde ocurren una serie de eventos complejos para entrar al haz vascular de la planta (xilema) y posteriormente trasladarse a la estela vía simplasto, para ser traslocadas a las hojas. Para lograr que las NPs entren a la célula es necesario tener en cuenta ciertas consideraciones como, que las NPs deberían estar en forma individual (no como aglomerados), así podrían penetrar las raíces con ayuda de la presión osmótica, fuerzas capilares, además de tener en cuenta la cantidad de NPs que existan en el medio acuoso y tamaño homogéneo de las mismas, en caso que las NPs se movieran vía apoplasto (Tripathi *et al.*, 2017).

Navarro *et al* (2008a, 2008b) indica que las paredes celulares con espesor alrededor de 5 a 20 nm funcionan como tamices naturales, donde la pared celular se configura para que las NPs atraviesen y puedan llegar a la membrana plasmática. Además, que las nanopartículas pueden inducir la formación de nuevos poros de gran tamaño que permiten la introducción de grandes nanopartículas a través de las paredes celulares. Por lo que el mecanismo de absorción de NPs a las células podría darse como un mecanismo de transporte activo, que incluye varios procesos celulares como: señalización, reciclado y regulación de la membrana plasmática. Podría ser un comportamiento semejante al de una membrana animal, así la absorción se daría por medio de vesículas que podrían ser dependientes de clatrina, que posteriormente podrían entrar a la célula por vías como: a) pinocitosis y b) endocitosis en fase líquida

(Tripathi *et al.*, 2017). También se ha demostrado el transporte intercelular de nanopartículas por medio de los plasmodesmos (Lin *et al.*, 2017).

LITERATURA CITADA

- Abdel-Aziz, H. M., Hasaneen, M. N., Omer, A. M. (2016). Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(1), 0902.
- Begum, P., Ikhtiari, R., Fugetsu, B. (2011). Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. *Carbon*, 49(12), 3907-3919.
- Corradini, E., De Moura, M. R., Mattoso, L. H. C. (2010). A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters*, 4(8), 509-515.
- Dang, Y., Zhang, Y., Fan, L., Chen, H., Roco, M. C. (2010). Trends in worldwide nanotechnology patent applications: 1991 to 2008. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(3), 687-706.
- Foladori, G., Figueroa, E. A., Lau, E. Z., Robles-Belmont, E., Appelbaum, R., Parker, R. (2016). Sectores económicos de potencial aplicación de las patentes de nanotecnologías en México. *CIENCIA Ergo-Sum*, 23(3), 255-260.
- Foladori, G., Figueroa, S., Edgard, Z. L., Invernizz, N. (2012). Características distintivas del desarrollo de las nanotecnologías en América Latina. *Sociologias*, 14(30), 330-363.
- Fraceto, L. F., Grillo, R., de Medeiros, G. A., Scognamiglio, V., Rea, G., Bartolucci, C. (2016). Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have?. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 20.
- Gerendás, J., Sattelmacher, B. (1997). Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (Cucurbita pepo convar. giromontiina). In *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*, ed. Springer. pp. 75-80. Netherlands.

- Golbashy, M., Sabahi, H., Allahdadi, I., Nazokdast, H., Hosseini, M. (2017). Synthesis of highly intercalated urea-clay nanocomposite via domestic montmorillonite as eco-friendly slow-release fertilizer. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(1), 84-95.
- Grillo, R., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F. (2016). Nanotechnology applied to bio-encapsulation of pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 1231-1234.
- Helal, N. A. S. (2013). Nanotechnology in Agriculture: A Review. *Poljoprivreda i Sumarstvo*, 59(1), 117.
- Hossain, K. Z., Monreal, C. M., Sayari, A. (2008). Adsorption of urease on PE-MCM-41 and its catalytic effect on hydrolysis of urea. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(1), 42-50.
- Jordan, C. C., Kaiser, I., Moore, V. C. (2014). Nanotechnology Patent Literature Review: Graphitic Carbon-Based Nanotechnology and Energy Applications Are on the Rise. *Nanotechnology Law & Business*, 11(1), 111-125.
- Kanjana, D. (2015). Potential applications of nanotechnology in major agriculture divisions-A Review. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 8(3), 699-714.
- Karunaratne, V., Kottegoda, N., de Alwis, A. (2012). Nanotechnology in a world out of balance. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 40(1), 3-8.
- Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, N., Karunaratne, V. (2011). A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood. *Current Science*, 101(1), 73-78.
- Kottegoda, N., Sandaruwan, C., Priyadarshana, G., Siriwardhana, A., Rathnayake, U. A., Berugoda-Arachchige, D. M., Kumarasinghe, A. R., Dahanayake, D., Kurunaratne, V., Amaratunga, G. A. (2017). Urea-Hydroxyapatite Nanohybrids for Slow Release of Nitrogen. *ACS Nano*, 11(2), 1214-1221.

- Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J. S., Reid, M. L., Ratnikova, T. A., Rao, A. M., Luo, H., Ke, P. C. (2009). Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*, 5(10), 1128-1132.
- Liu, R., Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*, 514, 131-139.
- Manik, A., Subramanian, K. S. (2014). Fabrication and characterisation of nanoporous zeolite based N fertilizer. *African Journal of Agricultural Research*, 9(2), 276-284.
- Marschner, H. (2011). Functions of Macronutrients. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press. pp.135-190. Australia.
- Mérigout, P., Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J. P., Briand, X., Meyer, C., Daniel-Vedele, F. (2008). Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 147(3), 1225-1238.
- Millán, G., Agosto, F., Vázquez, M., Botto, L., Lombardi, L., Juan, L. (2008). Uso de clinoptilolita como un vehículo de fertilizantes nitrogenados en un suelo de la región Pampeana de Argentina. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(3), 293-302.
- Mishra, S., Singh, H. B. (2015). Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1097-1107.
- Misra, A. N., Misra, M., Singh, R. (2013). Nanotechnology in agriculture and food industry. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 16(2), 1-9.
- Morris Jr, S. M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 87-105.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, P. H., Sigg, L. (2008a). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372-386.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. (2008b). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959-8964.

- Nuruzzaman, M., Rahman, M. M., Liu, Y., Naidu, R. (2016). Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(7), 1447-1483.
- Roshanravan, B., Mahmoud Soltani, S., Mahdavi, F., Abdul Rashid, S., Khanif Yusop, M. (2014). Preparation of encapsulated urea-kaolinite controlled release fertiliser and their effect on rice productivity. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26(4), 249-256.
- Roshanravan, B., Soltani, S. M., Rashid, S. A., Mahdavi, F., Yusop, M. K. (2015). Enhancement of nitrogen release properties of urea–kaolinite fertilizer with chitosan binder. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 27(1), 44-51.
- Sarkar, S., Datta, S. C., Biswas, D. R. (2014). Synthesis and characterization of nanoclay–polymer composites from soil clay with respect to their water-holding capacities and nutrient-release behavior. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(6), 39951.1-39951.8.
- Shamsudin, I. S., Anuar, M. S., Yusof, Y. A., Hanif, A. H. M., Tahir, S. M. (2014). Effect of particle size on direct compaction of urea fertilizer. *Particulate Science and Technology*, 32(6), 544-553.
- Solanki, P., Bhargava, A., Chhipa, H., Jain, N., Panwar, J. (2015). Nano-fertilizers and their smart delivery system. *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. ed. Springer. pp. 81-101. Netherlands.
- Stankovich, S., Dikin, D. A., Dommett, G. H. B., Kohlhaas, K. M., Zimney, E. J., Stach, E. A., Piner, R. D., Nguyen, S.T., Ruoff, R. S. (2006). Graphene-based composite materials. *Nature*, 442, 282-286.
- Subbaiya, R., Priyanka, M., Selvam, M. M. (2012). Formulation of green nano-fertilizer to enhance the plant growth through slow and sustained release of nitrogen. *Journal of Pharmacy Research*, 5(11), 5178-5183.
- Subramanian, K. S., Thirunavukkarasu, M. (2017). Nano-fertilizers and Nutrient Transformations in Soil. *Nanoscience and Plant–Soil Systems*. ed. Springer. pp. 305-319. Netherlands.

- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C., Prasad, S. M., Dubey, N. K., Chauhan, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12.
- Wang, X., Ma, G., Tian, X., Wang, Y. (2010). Effects of NMUrea on rice yield and agronomic nitrogen efficiency. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 16(6), 1479-1485.
- Wang, X., Wang, Y., Tian, X., Ma, G. (2011). Effects of NMUrea on nitrogen runoff losses of surface water and nitrogen fertilizer efficiency in paddy field. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 27(1), 106-111.
- Wanyika, H., Gatebe, E., Kioni, P., Tang, Z., Gao, Y. (2012). Mesoporous silica nanoparticles carrier for urea: potential applications in agrochemical delivery systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(3), 2221-2228.
- Xiaoyu, N., Yuejin, W., Zhengyan, W., Lin, W., Guannan, Q., Lixiang, Y. (2013). A novel slow-release urea fertiliser: Physical and chemical analysis of its structure and study of its release mechanism. *Biosystems Engineering*, 115(3), 274-282.
- Yamamoto, C. F., Pereira, E. I., Mattoso, L. H., Matsunaka, T., Ribeiro, C. (2016). Slow release fertilizers based on urea/urea-formaldehyde polymer nanocomposites. *Chemical Engineering Journal*, 287, 390-397.
- Zarebyaneh, H., Bayatvarkeshi, M. (2015). Effects of slow-release fertilizers on nitrate leaching, its distribution in soil profile, N-use efficiency, and yield in potato crop. *Environmental Earth Sciences*, 74(4), 3385-3393.
- Zhang, M., Gao, B., Chen, J., Li, Y., Creamer, A. E., Chen, H. (2014). Slow-release fertilizer encapsulated by graphene oxide films. *Chemical Engineering Journal*, 255, 107-113.

CAPÍTULO 2 FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANO-FERTILIZANTE COMO FUENTE DE N

2.1 INTRODUCCIÓN

El N limita el crecimiento de las plantas en la mayoría de los ecosistemas terrestres y acuáticos. Las plantas poseen toda una serie de proteínas implicadas en la asimilación de nitrógeno, no sólo para nitrato y amonio, también para los aminoácidos, péptidos, nucleótidos, productos de degradación y urea. La urea como fuente de N es absorbida por las plantas, es un intermedio en el catabolismo de la arginina. Aproximadamente la mitad de todo el nitrógeno utilizado para la producción de cultivos es aplicado como urea (Witte, 2011).

Desde un punto de vista económico, la urea es uno de los fertilizantes nitrogenados comerciales más importantes. Sin embargo, su aplicación en suelo involucra pérdidas significativas de N a través de la volatilización de NH_3^+ a la atmósfera y la emisión de gases de efecto invernadero (Yamamoto *et al.*, 2016). Se estima que entre el 40-70% del nitrógeno aplicado en fertilizantes convencionales no es aprovechado por las plantas debido a que se pierde en el ambiente (Solanki *et al.*, 2015). Sin embargo, la urea como fuente orgánica de N rara vez se usa en cultivos hidropónicos para la producción de hortalizas, aunque se han reportado algunos éxitos en la reducción de la acumulación de nitratos en vegetales de hoja mediante el reemplazo parcial de nitrato con urea en la alimentación (Tan *et al.*, 2000).

En los últimos años, la demanda de fertilizantes se incrementó y la urgente necesidad de un uso más eficiente de estos materiales, llevó al desarrollo de nano-fertilizantes con características de liberación lenta o controlada (Corradini *et al.*, 2010). Los nano-fertilizantes hacen referencia a productos a escala nanométrica que proveen nutrientes a un cultivo y que tienen el potencial de superar en gran medida a los fertilizantes convencionales, debido a que se podrían proporcionar mecanismos para sincronizar la liberación de los nutrientes de acuerdo a la absorción de los cultivos; esto debido a la no interacción de los compuestos con el suelo, el agua y los microorganismos (DeRosa *et al.*, 2010). En este sentido, los fertilizantes con la implementación de la nanotecnología, tendrían la capacidad de incrementar el crecimiento y rendimiento de los cultivos, aumentar la eficiencia en el uso de fertilizantes, reducir la pérdida de nutrientes y minimizar los impactos ambientales adversos (Liu y Lal 2015).

Los biopolímeros ofrecen una variedad de propiedades las cuales son apropiadas para la liberación controlada de materiales encapsulados. Hoy en día, estos compuestos han ganado una enorme atención debido a sus diversas aplicaciones en varios campos, especialmente en áreas de la salud y agricultura (Kumar *et al.*, 2014). El alginato, extraído de algas pardas, es un polisacárido lineal no ramificado que se conforma por unidades de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulorónico unidas por enlaces glucosídicos 1-4 (Campos *et al.*, 2015). Debido a su biocompatibilidad y nula toxicidad, el alginato de sodio se ha utilizado como agente acarreador para la liberación controlada de diversos fármacos (Sarmiento *et al.*, 2006; Bagre *et al.*, 2013; Tahtat *et al.*, 2013) y pesticidas (Kumar *et al.*, 2014; Kulkarni *et al.*, 2000). Sin embargo, no existen reportes de su uso en sistemas de liberación controlada de fertilizantes agrícolas.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar y caracterizar un nano-fertilizante fuente de nitrógeno, y evaluar su función como un sistema de liberación controlada mediante pruebas in vitro.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Sustancias químicas

Para la elaboración de las nanopartículas se empleó alginato de sodio (Sigma Aldrich, St Louis EEUU), urea (Productos Químicos de Monterrey S.A. de C.V.) y glutaraldehído (Merck, Darmstadt, Alemania). Se usó agua desionizada ($18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$) en todos los experimentos y análisis.

2.2.2 Elaboración de las nanopartículas

En un típico experimento, se disolvieron 0.2 g de urea y 0.4 g de alginato de sodio en 100 mL de agua desionizada a 120 °C. La solución se filtró con una unidad de filtración Millex-HV (0.45 μm , Millipore). La solución se mantuvo en agitación y calentamiento (120 °C) durante 30 min. Después se agregaron 4 mg de glutaraldehído y la solución se mantuvo en agitación durante 20 h a temperatura ambiente. Finalmente, la solución se sonó durante 60 min. En la formación de las nanopartículas se empleó un Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, Suiza), se utilizó una membrana de 4.0 μm . La temperatura de secado dentro del equipo fue de 100 °C a una presión de 35 Mbar. El polvo resultante se recolectó de la base del equipo y se almacenó hasta su caracterización. Todo el procedimiento se repitió para preparar nanopartículas sin carga para ser usadas como control.

2.2.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM) y energía dispersiva de rayos X (EDS)

La morfología, tamaño y análisis elemental de las nanopartículas se evaluaron con un microscopio electrónico de barrido JSM-6390LV (JEOL, Japón), equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (EDS). Previamente, las muestras se recubrieron con oro mediante sputtering (Desk IV, Denton Vacuum). Las micrografías se tomaron a una magnificación de 7000X a un voltaje acelerador de 20 kV.

2.2.4 Potencial zeta

La carga superficial de las partículas en solución o potencial zeta se determinó en un Zetasizer nano (ZS ZEN3600, Malvern Instruments, UK). Para realizar el análisis se diluyó 2.5 mg de muestra en 10 mL de buffer de fosfato a pH 7.4, que se mantuvo en agitación durante 10 min. Se tomaron alícuotas de 1 mL para realizar la lectura en el equipo, a temperatura ambiente. Los cálculos de movilidad electroforética se convirtieron en valores de potencial zeta, con base en el modelo de [Smoluchowski \(1921\)](#). Se obtuvieron diez lecturas para calcular la carga eléctrica promedio.

2.2.5 Calorimetría diferencial de barrido

Un calorímetro diferencial de barrido, DSC Pyris 1 (Perkin Elmer, USA) se empleó para determinar las propiedades térmicas de las nanopartículas y sus precursores. Muestras de 2 mg se pesaron en cápsulas de aluminio (No 0219-0062), y posteriormente selladas. La velocidad de calentamiento del equipo fue de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, en un intervalo de temperatura de 30 a 300°C . La calibración de la temperatura y del flujo de calor se realizó

con un material de referencia (indio, No. 0319-0033). En todas las mediciones una cápsula vacía se utilizó como referencia.

2.2.6 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Para evaluar las posibles interacciones entre la urea y alginato dentro de la nanopartícula, se realizaron determinaciones de FTIR, por medio del equipo Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU). Los análisis se realizaron con una celda de reflectancia total atenuada (ATR), en un rango de 4000–600 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} a los 32 scans.

2.2.7 Pruebas de liberación de nitrógeno

Para evaluar la liberación de N *in vitro*, 2 g de material se disolvieron en 200 mL de agua desionizada, y también 2 g de las nanopartículas sin carga se disolvieron en 200 mL de agua desionizada. Las muestras se mantuvieron en agitación durante 72 h a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 10 mL a las 24, 26, 48, 50 y 72 horas, las cuales se filtraron (Papel Whatman 542, Buckingham, Reino Unido) y sometieron para cuantificación de nitrógeno mediante el método Semimicro-Kjeldahl, descrito por Bremner (1965).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM) y energía dispersiva de rayos X (EDS)

De acuerdo con las SEM, las nanopartículas de alginato cargadas con urea presentaron morfología esférica uniforme y superficie lisa (**Figura 2.1a**), con tamaños en un intervalo de 100 a 1200nm y un valor promedio de 650nm (**Figura 2.1b**). Se observó el tamaño de las partículas una distribución normal ($R^2=0.87$). De acuerdo con Beck-Broichsitter *et al.* (2012) y Schafroth *et al.* (2012), las variables experimentales que afectan el tamaño de partículas producidas por nano spray-drying son la concentración y naturaleza del polímero, y el diámetro de malla de pulverización empleada. Por medio de un microanálisis mediante EDS (**Figura 2.1c**) se determinó la composición elemental de las partículas, donde se verificó la presencia de nitrógeno en aproximadamente 16%, lo que corresponde con la cantidad teórica de nitrógeno agregado durante la preparación de las partículas. Además, mediante un mapeo por EDS, se observó que el nitrógeno se encontró uniformemente distribuido por toda la matriz polimérica (Figura 2.2a y 2.2b).

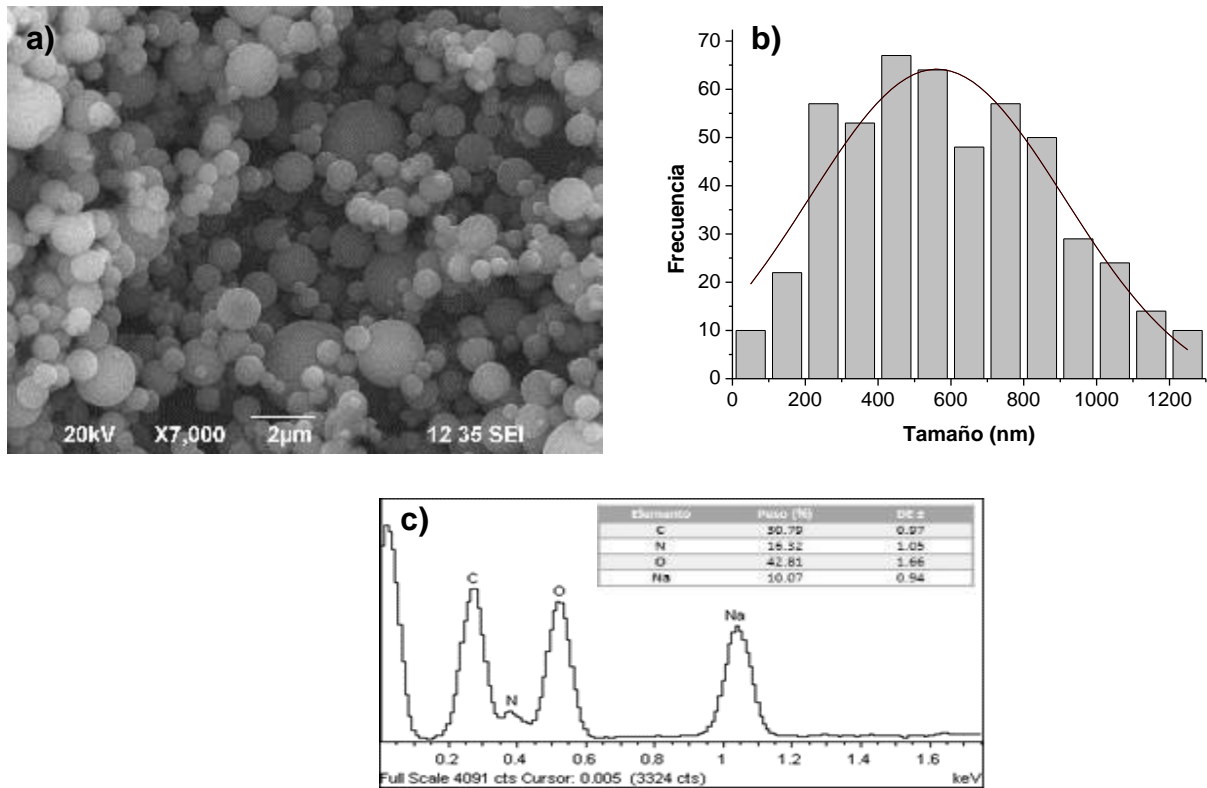


Figura 2.1 Nanopartículas de alginato cargadas con urea: a) Micrografía de SEM que muestran tamaño y forma, b) histograma de distribución de tamaño y c) Espectro de EDS indicando la composición elemental de las nanopartículas.

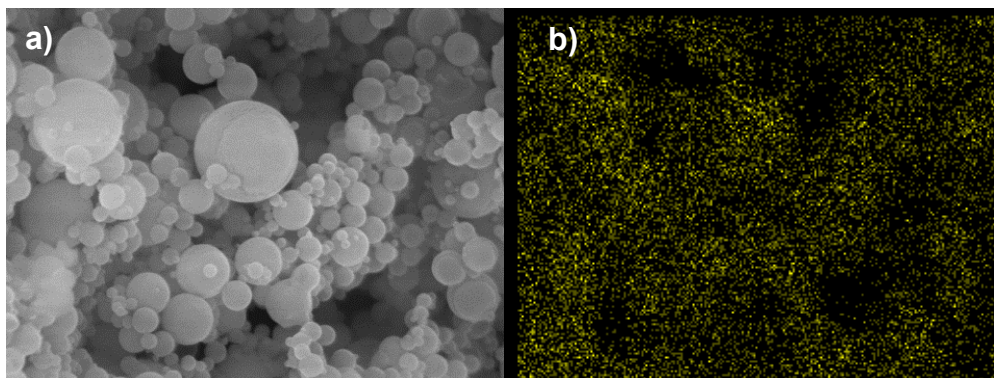


Figura 2.2 Mapeo de a) Micrografía de SEM que muestran tamaño y forma y b) Micrografía de EDS que muestra la distribución uniforme de nitrógeno en la red polimérica.

2.3.2 Potencial Zeta

La determinación del potencial zeta permite hacer predicciones a cerca de la estabilidad de las partículas dispersas en un medio acuoso. Entre mayor sea el valor absoluto de potencial zeta, la agregación de las partículas tenderá a disminuir. El potencial zeta promedio o carga superficial de las nanopartículas de alginato fue de -36 ± 4 mV, mientras que el potencial zeta de las partículas cargadas con urea fue de -39 ± 3 mV. Se observó que la carga negativa de las nanopartículas fue muy similar incluso con la incorporación de urea, lo que se puede explicar por la alta relación superficie/volumen de las partículas. La naturaleza química de los polímeros es uno de los factores que influyen determinantemente en la carga superficial de partículas en suspensión, por lo que el comportamiento aniónico de las suspensiones examinadas en este estudio se puede tribuir a la carga negativa de los grupos carboxilo del alginato (Mora *et al.*, 2010; Rescignano *et al.*, 2015). Katuwavila *et al.* (2016) reportaron valores similares de potencial zeta para nanopartículas de alginato y nanopartículas de alginato cargadas con hierro.

2.3.3 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros FTIR de los precursores que se emplearon (alginato y urea) y de las nanopartículas con y sin urea que se elaboraron en esta investigación (Figura 3). El espectro del alginato reveló bandas de absorción características a 3256 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace O–H), 2925 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace O–H en el grupo carboxílico), 1591 (vibración de tensión asimétrica del anión carboxilato), 1401 cm^{-1} (vibración de tensión simétrica del anión carboxilato) y 1021 cm^{-1} (vibración de

tensión asimétrica del enlace C–O–C). Por su parte la urea presentó bandas características a 3424 cm^{-1} (vibración de tensión asimétrica del enlace N–H), 3323 , 3253 cm^{-1} (vibraciones de tensión simétrica del enlace N–H), 1676 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace C=O), 1587 cm^{-1} (vibración de flexión del enlace N–H) y 1457 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace C–N). Al analizar los espectros de las nanopartículas con y sin urea se observaron modificaciones en algunas bandas características.

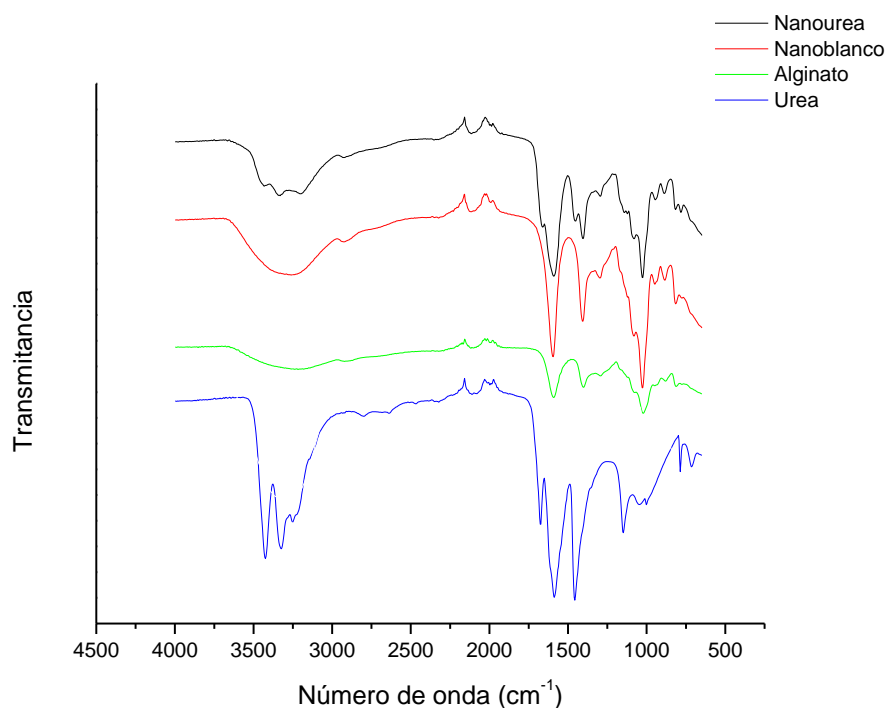


Figura 2.3 Espectros de FTIR de los precursores empleados (alginato y urea) y de las nanopartículas de alginato con urea (Nanourea) y sin urea (Nanoblanco)

La banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace C–N (1457 cm^{-1}) de la urea, se muestra en el espectro de las nanopartículas cargadas con una disminución en su intensidad. Por otro lado, las bandas a 3424 , 3323 y 3253 cm^{-1} se desplazaron a números de onda de 3431 , 3331 y 3200 cm^{-1} respectivamente, siendo evidente también

la disminución en la intensidad de las señales. Estas modificaciones en el número de onda e intensidad de las bandas se pueden atribuir a la participación de los grupos amino de la urea en la formación de enlaces químicos por efecto del glutaraldehído. Por su parte, la banda se relaciona con la vibración de tensión asimétrica del enlace C–O–C (1021 cm^{-1}) en el alginato, aparece con mayor intensidad en los espectros FTIR de ambos tipos de nanopartículas, lo que sugiere un aumento en los grupos C–O–C. Lo anterior hace suponer que el glutaraldehído no solo favoreció las interacciones urea-alginato, sino también promovió la formación de enlaces químicos entre polímeros del polisacárido.

2.3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La Figura 2.4 muestra los termogramas de DSC de urea, nanopartículas de alginato de sodio (Np-Alg) y nanopartículas de alginato de sodio cargadas con urea (Np-Alg-Urea). El termograma de la urea muestra dos picos endotérmicos bien definidos, que se ubican a $139.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $238.3\text{ }^{\circ}\text{C}$, los cuales están relacionados con el punto de fusión y la descomposición térmica de la urea, respectivamente (Schaber *et al.*, 2004). Por su parte las Np-Alg exhibieron un pico endotérmico a $120.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un pico exotérmico a $237.8\text{ }^{\circ}\text{C}$. De acuerdo con Bagre *et al.* (2013) y Sarmiento *et al.* (2006), los picos endotérmicos están correlacionados con la pérdida de agua que se asocian a los grupos hidrofílicos del alginato, mientras que los picos exotérmicos son resultado de la degradación debido a la deshidratación y reacciones de despolimerización. Se observó en el termograma de DSC, las NP Alg-urea mostraron un comportamiento térmico distinto al de sus componentes individuales, como consecuencia de la interacción entre los componentes.

Un nuevo pico endotérmico se exhibió a 188.3 °C, mientras que el pico exotérmico característico de la degradación del polímero se desplazó a una mayor temperatura (249 °C). Lo anterior es un indicativo de que las NP Alg-urea presentaron mayor estabilidad térmica en comparación con sus componentes individuales, lo cual se puede atribuir al establecimiento de enlaces químicos entre alginato-alginato y alginato-urea durante el proceso de formación de las nanopartículas.

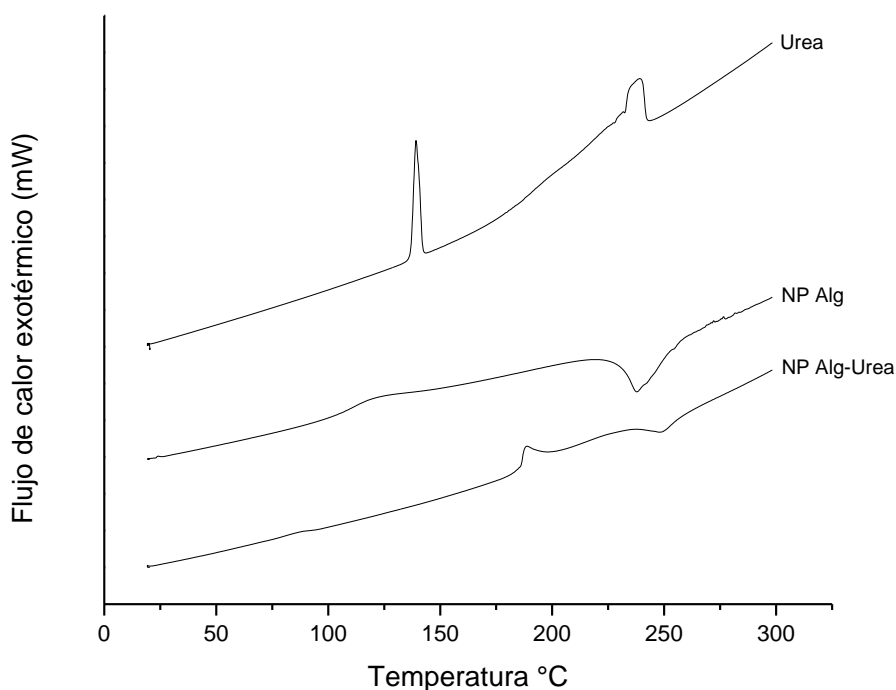


Figura 2.4 Termogramas de DSC mostrando las transiciones de fase ocurridas durante el proceso de calentamiento de la urea, nanopartículas sin urea (NP Alg) y nanopartículas con urea (NP Alg-Urea).

2.3.5 Liberación de N de las nanopartículas

La **Figura 2.5** muestra que la urea se liberó de la matriz polimérica de manera controlada y proporcional al tiempo de agitación. De acuerdo con la cinética de liberación, las

nanopartículas de alginato liberaron el 83% de su carga (13300 ppm de N) a las 72h a partir del inicio del experimento. De acuerdo con Jarosiewicz y Tomaszewska (2003) y Beck-Broichsitter *et al.* (2012), el tiempo de liberación está en función de la relación polímero:fármaco, esto haría suponer que, si se aumenta la concentración del polímero se podría incrementar el tiempo de liberación.

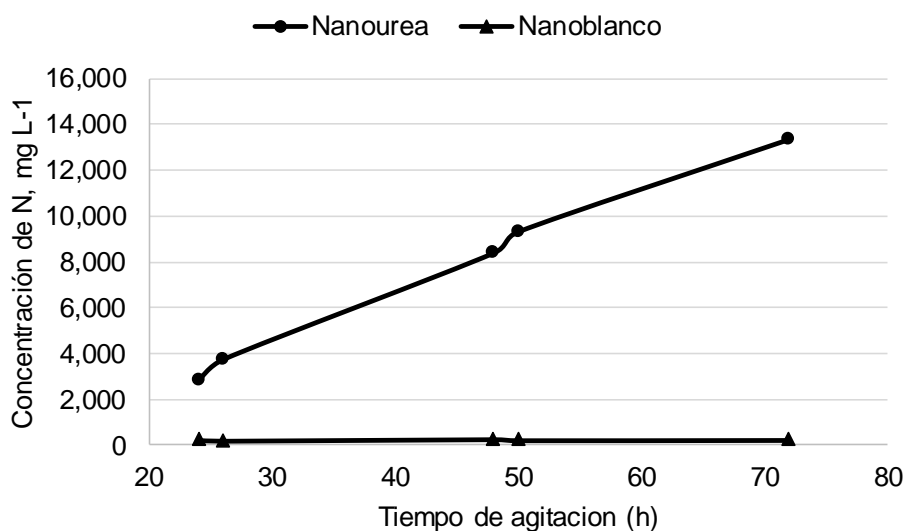


Figura 2.5 Liberación de nitrógeno de las nanopartículas.

CONCLUSIONES

Nanopartículas de alginato cargadas con urea de morfología esférica y tamaños promedio menores a 700 nm, fueron obtenidas mediante secado por aspersion. La incorporación de glutaraldehído como agente entrecruzante permitió el establecimiento de enlaces químicos entre alginato-alginato y alginato-urea. Estas interacciones fueron responsables en gran medida de la estabilidad térmica presentada por los materiales. De acuerdo con el valor de potencial zeta (-39 mV), el comportamiento de las partículas fue estable al ser dispersadas en un medio acuoso. Las nanopartículas elaboradas actuaron

como sistemas de liberación controlada. Aproximadamente el 80% de la carga de N se liberó a las 72h de iniciado el experimento. Los resultados son prometedores y crean una posibilidad real de que el material elaborado en la presente investigación pueda ser potencialmente útiles como nano-fertilizantes en la agricultura.

LITERATURA CITADA

- Bagre, A. P., Jain, K., Jain, N. K. (2013). Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: in vitro and in vivo assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1), 31-40.
- Beck-Broichsitter, M., Schweiger, C., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., Kissel, T. (2012). Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 158(2), 329-335.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9. ed.* Black, C. A. pp. 1149-1178. Madison, WI, USA.
- Corradini, E., De Moura, M. R., Mattoso, L. H. C. (2010). A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters*, 4(8), 509-515.
- DeRosa, M. C., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R., Sultan, Y. (2010). Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnology*, 5(2), 91-91.
- Jarosiewicz, A., Tomaszewska, M. (2003). Controlled-release NPK fertilizer encapsulated by polymeric membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 413-417.
- Katuwavila, N. P., Perera, A. D. L. C., Dahanayake, D., Karunaratne, V., Amaratunga, G. A., Karunaratne, D. N. (2016). Alginate nanoparticles protect ferrous from oxidation: Potential iron delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1), 404-409.
- Kulkarni, A. R., Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Dave, A. M., Mehta, M. H. (2000). Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *Journal of Controlled Release*, 63(1), 97-105.
- Kumar, S., Bhanjana, G., Sharma, A., Sidhu, M. C., Dilbaghi, N. (2014). Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1061-1067.

- Liu, R., Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*, 514, 131-139.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1), 113-142.
- Campos, E. V. R., De Oliveira, J. L., Fraceto, L. F., Singh, B. (2015). Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 47-66.
- Rescignano, N., Fortunati, E., Armentano, I., Hernandez, R., Mijangos, C., Pasquino, R., Kenny, J. M. (2015). Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 445, 31-39.
- Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., Ribeiro, A. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 1-7.
- Schaber, P. M., Colson, J., Higgins, S., Thielen, D., Anspach, B., Brauer, J. (2004). Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. *Thermochimica Acta*, 424(1), 131-142.
- Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U. Y., Makne, S., Douroumis, D. (2012). Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 8-15.
- Smoluchowski, M. V. (1921). Electra-osmosis and streaming currents. *Handbuch der Elektrizitat und der Magnetismus*, 2, 366-428.
- Solanki, P., Bhargava, A., Chhipa, H., Jain, N., Panwar, J. (2015). Nano-fertilizers and their smart delivery system. In *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. ed. Springer. pp. 81-101. Netherlands.
- Tahtat, D., Mahlous, M., Benamer, S., Khodja, A. N., Oussedik-Oumehdi, H., Laraba-Djebari, F. (2013). Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 160-168.

- Tan, X. W., Ikeda, H., Oda, M. (2000). The absorption, translocation, and assimilation of urea, nitrate or ammonium in tomato plants at different plant growth stages in hydroponic culture. *Scientia horticultrae*, 84(3), 275-283.
- Yamamoto, C. F., Pereira, E. I., Mattoso, L. H., Matsunaka, T., Ribeiro, C. (2016). Slow release fertilizers based on urea/urea–formaldehyde polymer nanocomposites. *Chemical Engineering Journal*, 287, 390-397.
- Witte, Claus-Peter. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180 (3), 431-438.

CAPÍTULO 3 EVALUACIÓN DE UN NANO-FERTILIZANTE CON FUENTE DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA* L.).

3.1 INTRODUCCIÓN

Las prácticas agrícolas recientes asociadas con la Revolución Verde han aumentado el abastecimiento mundial de alimentos. Pero se ha tenido un impacto perjudicial sobre el medio ambiente, por lo cual de la necesidad de métodos agrícolas sostenibles y sustentables. La agricultura tiene como reto aumentar la productividad, restaurar los ecosistemas, disminuir la contaminación y realizar un suministro eficiente de insecticidas, fungicidas, herbicidas y fertilizantes, con la finalidad de incrementar la producción de alimentos y cubrir la demanda de la población (Mukhopadhyay, 2014).

En México el uso de fertilizantes y agroquímicos se encuentra en casi el 100 % de los sistemas agrícolas, donde la urea es el fertilizante de mayor consumo, actualmente se importa el 80 % del consumo total de estos productos (Secretaría de Economía, 2017).

El costo de la fertilización en los sistemas productivos representa en promedio entre el 30 % y 50 % del costo total de producción; pero las plantas solo aprovechan del 25 al 50 % de la cantidad aplicada, la cual se pierde por lixiviación en el suelo o se libera en forma de gases de nitrógeno como amoníaco y óxido de nitrógeno (Kottegoda, *et al.*, 2011). Lo anterior genera pérdidas económicas, además de un deterioro o contaminación de recursos naturales como la salinización de suelos y/o la eutrofización del agua (Azeem, *et al.*, 2014).

La nanotecnología ha llegado a revolucionar la industria de fertilizantes, haciendo un “fertilizante inteligente” a través de sistemas de suministro inteligentes, en el que los fertilizantes de liberación lenta o controlada se pueden desarrollar mediante el uso de la técnica de nanoencapsulación (Kanjana, 2015). A medida que avanza, puede tener un impacto significativo en el abordaje de las crisis de sostenibilidad que enfrentan las economías emergentes. Se sabe que los nano-fertilizantes liberan nutrientes de forma lenta y constante durante más de 30 días, lo que puede ayudar a mejorar la eficiencia del uso de nutrientes, sin ningún efecto adverso asociado (Subramanian y Thirunavukkarasu, 2017). Los trabajos realizados con nano-fertilizantes son muy limitados, pero la literatura indica que estos fertilizantes tienen potencial en el mantenimiento de la productividad agrícola.

La lechuga es una hortaliza que se produce y consume a nivel mundial. En el año 2014, se registró una producción mundial de 24,976,317 t con una superficie sembrada de 1,158,979 ha; donde China fue el principal productor seguido de Estados Unidos. México es el décimo productor a nivel mundial (FAO, 2015) con 406, 678 toneladas y una superficie sembrada de 19,440 hectáreas en el año 2015 (SIAP, 2015). México es el principal país exportador de hortalizas a nivel mundial, y aunque el jitomate es la principal hortaliza de exportación, en el año 2016 se registró un volumen de exportación de 86,735 t de lechuga, que generaron un valor económico de 89 millones de dólares (Secretaría de Economía, 2017). El estado de Guanajuato es el principal productor de dicha hortaliza, seguido del estado de Zacatecas (SIAP, 2015).

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de un nano-fertilizante de urea como fuente de N en parámetros de crecimiento, bioquímicos y nutrimentales en plantas de lechuga durante etapa vegetativa; lo anterior en ausencia de otros nutrimentos constituyentes de la solución nutritiva de Steiner, para evitar interacciones de los demás elementos. Se usó como referencia la concentración de N de solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Ubicación del experimento

El cultivo de lechuga se instaló en un sistema de cultivo en solución dentro de un invernadero tipo cenital ubicado en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, a 19° 29´ latitud Norte, 98° 53´ longitud Oeste y a una altitud de 2,250 m de altitud, en primavera del 2017.

3.2.2 Material vegetal y condiciones del experimento

El material vegetal que se empleó fue lechuga (*Lactuca sativa L.*) cultivar Starfighter. Las plántulas fueron adquiridas de la empresa Germiplant, en Texcoco Estado de México. Pevio al trasplante, a todas las plantas se les retiró la turba del sistema radical, y durante 16 días estuvieron en recipientes de 0.5 L de capacidad con 400 mL de solución nutritiva de Steiner al 25 % de su concentración en un rango de pH de 6.0 - 6.5, la solución nutritiva fue preparada con reactivos grado analítico, utilizando 0.27 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4H₂O; 0.08 g L⁻¹ de KNO₃; 0.03 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0.12 g L⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O y 0.07 g L⁻¹ de K₂SO₄ (**Cuadro 3.1**). La solución nutritiva se complementó con micronutrimentos en

las siguientes concentraciones: 0.4 mg L⁻¹ de Mn; 0.03 mg L⁻¹ de Cu; 0.22 mg L⁻¹ de B; 0.006 mg L⁻¹ de Zn y 0.012 mg L⁻¹ de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 1.3 mg L⁻¹ a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970). La solución fue aireada mediante un compresor (DeWalt, D2002M-WK 1.5 hP, USA) y un sistema de distribución de aire con mangueras de 16 mm de diámetro. Se colocaron dos plántulas por recipiente, cada tres días se repuso la solución nutritiva perdida, con agua destilada y ocho días después del trasplante (DDT) se realizó un cambio total de la solución nutritiva. Trascurridos los 16 DDT se aplicaron los tratamientos.

Cuadro 3.1 Composición de solución nutritiva de Steiner al 25 % de su concentración (en mol_c m⁻³).

	NO₃⁻	H₂PO₄⁻	SO₄⁻²	Ca⁺²	Mg⁺²	K⁺
mol_c m⁻³	3	0.25	1.75	2.25	1.0	1.75

3.2.3 Tratamientos evaluados y diseño experimental

Se evaluaron nueve tratamientos que se describen en el **Cuadro 3.2**.

Cuadro 3.2 Tratamientos evaluados en lechuga cv. Starfighter.

Tratamiento	Código	Descripción
1	AD	Agua destilada (Blanco)
2	NPA	Nanopartículas de alginato sin carga de urea
3	NPA ϵ	Nanopartículas de alginato sin carga de urea con adición de enzima**
4	U25%	Urea 25 %*
5	U50%	Urea 50 %*
6	NU25%	Nanofertilizante-urea al 25 %*
7	NU50%	Nanofertilizante-urea al 50 %*
8	NU25% ϵ	Nanofertilizante-urea al 25 %* con adición de enzima**
9	NU50% ϵ	Nanofertilizante-urea al 50 %* con adición de enzima**

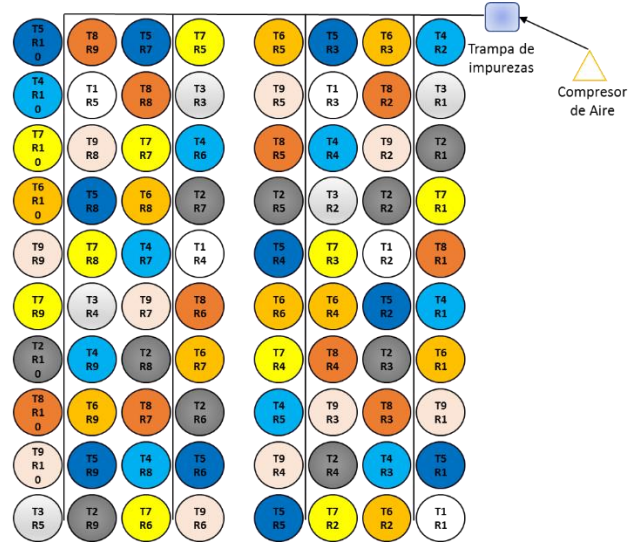
*Porcentaje de la concentración de N de la solución nutritiva Steiner

** Enzima alginatoliasa

Al aplicar los tratamientos se considera como cero días de tratamiento (DT), para los testigos se consideraron tres tratamientos. El tratamiento uno consistió únicamente de agua destilada, los tratamientos dos y tres contienen nanopartículas de alginato de sodio (0.274 g L^{-1} de nanopartículas de alginato sin carga de urea, obtenidas de la síntesis descrita en el capítulo anterior), con la diferencia de que en el tratamiento tres, se adicionó la enzima alginatoliasa (1 mg L^{-1} ; EC 4.2.2.3), debido a la naturaleza del polímero, se adiciona la enzima para catalizar la degradación de alginato por una reacción de beta-eliminación, en el enlace (1-4) entre beta-D-manuronato y alfa-L-

guluronato o beta-D-manuronato, generando oligosacáridos y liberando la molécula urea contenida en la nano-capsula. Los tratamientos cuatro y cinco consistieron en 25% (0.09 g L⁻¹ de CH₄N₂O) y 50 % (0.18 g L⁻¹ de CH₄N₂O) de la concentración de N de la solución nutritiva Steiner a partir de urea grado reactivo. Los tratamientos seis y ocho contenían nanopartículas cargadas con urea a una concentración del 25 % (0.274 g L⁻¹ de nano-fertilizante-urea) de la solución nutritiva Steiner, con la diferencia que en el tratamiento ocho, se adicionó enzima (1 mg L⁻¹). Finalmente, los tratamientos siete y nueve contenían nanopartículas cargadas con urea con una concentración de 50 % (0.548 g L⁻¹ de nano-fertilizante-urea) de la solución nutritiva Steiner, con la diferencia que al tratamiento nueve se le adicionó enzima (2 mg L⁻¹).

El estudio se estableció bajo un diseño completamente al azar, como unidad experimental se consideró a cada recipiente con dos plantas. La distribución de los tratamientos se muestra en la **Figura 3.1**. El pH de las soluciones que se empleó se mantuvo en un rango de 5.5 - 6.5, cada tres días se realizó el aforo a 400 mL con agua destilada y a los siete DT se realizó un cambio completo de la solución. El estudio se evaluó durante 13 días.



Nota: T#, R# número de tratamiento y repetición respectivamente

Figura 3.1 Distribución de tratamientos.

3.2.4 Variables evaluadas

Longitud de hoja. Mediante un flexómetro, se midió la longitud de las hojas desde la base hasta la punta de la hoja más grande. La primera medición se realizó al aplicar los tratamientos 0 días de tratamiento (DT), posteriormente a los 5, 9 y 13 DT.

Longitud y volumen de raíz. Se midió la longitud de la raíz, mediante un flexómetro, desde la base de la planta hasta la punta de la raíz más larga, las mediciones se realizaron a los 0, 5, 9 y 13 DT. El volumen de raíz se determinó mediante el uso de una probeta de 250 mL y agua destilada, las tomas de datos se realizaron a los 9 y 13 DT.

Número de hojas y área foliar. Se realizó conteo del número de hojas totales de las plantas de lechuga a los 13 DT. Mediante un integrador LI-3100 (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) se determinó el área foliar, considerando hojas jóvenes y maduras.

Diámetro de tallo. El diámetro del tallo se midió mediante un vernier analítico (Truper, CALDI-6MP, México) a los 13 DT.

Biomasa fresca. A los 9 y 13 DT se realizaron muestreos destructivos, en los cuales las plantas de lechuga fueron divididas en hojas y raíz, para determinar el peso fresco por separado de las estructuras empleando una balanza granataria.

Biomasa seca. Posterior a haber obtenido el peso fresco de las hojas y raíz por separado, las muestras fueron puestas en una estufa de circulación de aire forzado a 70 °C (HCF-125, Riossa, México) durante 48 h, para determinar el peso seco mediante una balanza analítica, los muestreos fueron realizados a los 9 y 13 DT.

Lecturas Spad. Transcurridos 13 DT, en ocho plantas por tratamiento se realizaron lecturas de unidades Spad mediante un medidor portátil Minolta SPAD-510.

Cuantificación de fenoles totales en hoja. La determinación se realizó a los 13 DT, para realizar el extracto y determinación de fenoles, se modificó la metodología de Quiroz-Reyes et al. (2013). La materia vegetal se sometió a extracción ultrasónica en una solución acuoetanólica (30:70, v:v), en proporción sólido-líquido 0.6:25 (g/mL) durante 5 min. Posteriormente, se tomó una alícuota de 20 µL para cada extracto, así también para el caso de la curva de calibración (diluciones de ácido gálico) y del control (agua destilada), todas las alícuotas se colocaron en tubos de plástico de 2 mL y posteriormente se adicionaron 1.4 mL de agua, seguido de 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (2N), la mezcla se agitó vigorosamente. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 3 min, que posteriormente se adicionó 300 µL de la solución de carbonato de sodio (20%, p:v) y se aforó con agua destilada a 2 mL. Posterior las muestras se incubaron nuevamente por 90 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 760 nm con un espectrofotómetro (MultiSkan GO),

donde a las lecturas se les restó la absorbancia de la muestra testigo en todas las lecturas y se empleó la ecuación 1, para determinar la concentración correspondiente de fenoles totales de los extractos. Los valores se reportan en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de materia vegetal seca. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Contenido Fenólico Total} \left(\frac{\text{mgE de ácido gálico}}{\text{g de extracto seco}} \right) = \frac{A_{760} + 0.0057}{0.005} \quad (1)$$

Concentraciones nutrimentales. A los 9 y 13 DT se determinó la concentración nutrimental a partir de material seco de hoja y raíz. Se realizó mediante digestión húmeda con 0.25 g de muestra seca, 2 mL de H₂SO₄: HClO₄ (2:1, v:v), 1 mL de H₂O₂, 350 °C, 2h. La concentración de N se determinó en extracto de digestión húmeda, mediante el método semi-micro-Kjeldahl descrito por [Bremner \(1965\)](#). La determinación de las concentraciones de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn y B se realizó lectura en los extractos resultantes la digestión del material seco, las lecturas de los elementos se midieron con el equipo de espectrometría de emisión e inducción por plasma (ICP-VARIAN 725-ES, Australia).

3.2.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un programa estadístico System Analytic Statistical ver. 9.4 (SAS, Institute, 2016), bajo un diseño experimental completamente al azar. El análisis de varianza y comparación de medias se realizó con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) ($\alpha \leq 0.05\%$).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Variables fisiológicas

A los 9 días de tratamiento la longitud de hojas en las plantas de lechuga mostró diferencias estadísticas significativas, el tratamiento urea 25% fue mayor (16.2 cm) y diferente estadísticamente a tres tratamientos (AD, NPAε y NU50%ε) (**Cuadro 3.3**).

Cuadro 3.3 Longitudes de hoja y raíz, y volumen de raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 9 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

Tratamiento	Longitud de hoja (cm)	Longitud de raíz (cm)	Volumen de raíz (cm ³)
AD	13.4 c	18.5 a	9.5 ab
NPA	14.9 abc	18.6 a	7.6 c
NPAε	14.5 bc	18.0 ab	8.9 bc
U25%	16.2 a	15.9 d	10.4 a
U50%	15.3 ab	17.7 abc	10.4 a
NU25%	14.7 abc	16.6 bcd	9.5 ab
NU50%	15.1 ab	16.5 bcd	9.1 ab
NU25%ε	15.3 ab	16.1 cd	8.9 bc
NU50%ε	14.3 bc	17.7 abc	8.5 bc

Medias ± DE con letra distinta en cada columna indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; n=9) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAε;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%ε.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%ε.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

La longitud de raíz también mostró diferencia estadística significativa, los tratamientos de agua destilada y nanopartículas de alginato sin carga de urea tuvieron mayor longitud de raíz (18.5 y 18.6 cm, respectivamente) y diferentes estadísticamente a cuatro tratamientos (U25%, NU25%, NU50% y NU25%ε) (**Cuadro 3.3**). Así mismo, el volumen de raíz evidenció diferencia estadística significativa, los tratamientos urea 25% y urea

50% mostraron mayor volumen de raíz (10.4 cm⁻³) y fueron estadísticamente diferentes a cuatro tratamientos (NPA, NPAE, NU25%E y NU50%E) (**Cuadro 3.3**).

Cuadro 3.4 Longitudes de hoja y raíz y volumen de raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

Tratamiento	Longitud		
	de hoja (cm)	Longitud de raíz (cm)	Volumen de raíz (cm ³)
AD	15.3 c	20.6 a	12.8 cd
NPA	17.4 b	20.6 a	11.9 d
NPAE	16.7 bc	19.9 ab	12.3 d
U25%	19.3 a	17.1 e	15.1 a
U50%	18.0 ab	19.6 abc	15.0 a
NU25%	17.7 b	17.9 cde	14.5 ab
NU50%	17.8 ab	18.1 bcde	14.1 abc
NU25%E	18.3 ab	17.6 de	13.0 bcd
NU50%E	17.0 b	19.1 abcd	11.9 d

Medias \pm DE con letra distinta en cada columna indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

Durante 13 días de tratamiento, las longitudes de hoja en las plantas de lechuga presentaron diferencia estadística significativa entre los tratamientos, urea 25% mostró mayor longitud de hojas (19.3 cm) y diferente estadísticamente a cinco tratamientos (AD, NPA, NPAE, NU25% y NU50%E) (**Cuadro 3.4**). La longitud de raíz también mostró diferencia estadística significativa entre tratamientos, las plantas de lechuga tratadas en agua destilada y nanopartículas de alginato sin carga de urea tuvieron mayor longitud (20.6 cm) y son diferentes estadísticamente a cuatro tratamientos (U25%, NU25%, NU50% y NU25%E) (**Cuadro 3.4**). En cuanto a volumen de raíz, los tratamientos

mostraron diferencias estadísticas significativas, urea 25% y urea 50% presentaron mayor volumen de raíz (15.1 y 15.0 cm³, respectivamente) y diferente estadísticamente a cinco tratamientos (AD, NPA, NPAε, NU25%ε y NU50%ε) (**Cuadro 3.4**).

En el **Cuadro 3.5** se muestran contrastes entre los tratamientos evaluados, se observan diferencias estadísticas significativas en los grupos de tratamientos testigos con tratamientos con alguna fuente de N. Cuando las plantas crecen exclusivamente con urea, las concentraciones de aminoácidos almacenados y transporte de nitrógeno se incrementan, dando como resultado concentraciones de aminoácidos totales más altas. Estos altos niveles de aminoácidos pueden contribuir a una disminución de crecimiento en la planta, tal vez porque estos aminoácidos indican la abundancia de nitrógeno, evitando una mayor absorción y distribución de nitrógeno (Witte, 2011). De acuerdo a lo anterior y a los resultados mostrados en el **Cuadro 3.4**, podemos decir que las plantas de lechuga tratadas con nanofertilizante-urea al 25% y nanofertilizante-urea al 50% con enzima, tratamientos estadísticamente diferentes a urea 25%, fueron los tratamientos con una mayor absorción de urea reflejada en una menor longitud en las hojas. Nicoulaud y Bloom (1996), obtuvieron resultados similares al aplicar urea en plantas de tomate, como la única fuente de N a diferentes concentraciones, la aplicación que mejor promovió el crecimiento de las plantas fue con una solución de urea al 0.2%, durante 10 días; sin embargo, la concentración más alta de urea (0.3%) reprimió el crecimiento, produciendo daños severos a las hojas.

Las plantas de lechuga cv. Starfighter de este experimento, después de 13 días de tratamiento, mostraron daño en las hojas con los tratamientos nanofertilizante-urea al

50% y nanofertilizante-urea al 50% con enzima (**Figura 3.2**). Resultados por aplicaciones foliares de urea ha sido reportados en hojas de soya tratadas con soluciones al 2% (Barel y Black, 1979), así como en trigo tratado con urea (Peltonen, 1993).



Figura 3.2 Daño foliar en planta de lechuga cv. Starfighter a los 13 días en los tratamientos nanofertilizante-urea al 25%, nanofertilizante-urea al 50%, nanofertilizante-urea al 25% con enzima y nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

La longitud de raíz muestra diferencia estadística significativa, en los contrastes de tratamientos testigo con tratamientos con fuente de N (**Cuadro 3.5**). Resultados similares a esta investigación se obtuvieron por López-Bucio *et al.* (2003) en *Arabidopsis*, donde mencionan que al aumento de la disponibilidad de N reduce el alargamiento de la raíz primaria a concentraciones altas (10 mM), mientras que a bajas concentraciones de N (10 μ M) el alargamiento de la raíz incrementa. De manera similar Forde (2014), demostró que la longitud de la raíz aumenta en condiciones de deficiencia de N.

La urea es una fuente de N y a su vez un metabolito importante en las plantas, cuando las plantas crecen exclusivamente con urea, el almacenamiento y transporte de nitrógeno en aminoácidos aumenta, en particular la glutamina y asparagina. La urea es sintetizada dentro de la mitocondria y es transportada posiblemente por acuaporinas al citoplasma. Otra fuente de urea en el citoplasma, es debido a la absorción de raíces y hojas, posteriormente la urea es hidrolizada por la enzima ureasa, los aminos derivados de urea se asimilan en glutamina vía glutamina sintetasa (GS); luego la glutamato sintasa (NADH-GOGAT) cataliza la formación de glutamato a través del ciclo GS-GOGAT, la alta concentración de aminos favorece la actividad de la GS (Mérigout *et al.*, 2008; Witte, 2011). Los tratamientos urea 25% y urea 50% mostraron estadísticamente los volúmenes de raíz mayores (**Cuadro 3.4 y 3.5**). Este efecto se atribuye que la urea absorbida es asimilada, que aumenta la concentración de aminos, lo cual favorece la actividad de la GS, y disminuye la concentración de glutamato, dando como resultado sistemas radiculares cortos y ramificados lo cual aumenta el volumen de raíz. En el caso de los tratamientos con nanofertilizante-urea con y sin enzima, la nano-encapsulación cumple la función de un sistema de liberación controlada de urea que se refleja en los resultados con un menor volumen de raíz en comparación con los tratamientos de urea convencional. Algunos estudios han examinado el efecto de los aminoácidos y péptidos en el crecimiento de la raíz y la ramificación. La presencia de concentraciones muy bajas de glutamato (<50 mM) en la punta de la raíz primaria, promueven un efecto distintivo en la arquitectura de raíz, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y estimulando raíces laterales dando como resultado un sistema radicular corto y ramificado (Forde, 2014).

Cuadro 3.5 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para de longitud de hoja, longitud de raíz y volumen de raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No	Tratamientos comparados	Longitud de hoja	Longitud de raíz	Volumen de raíz
		Pr>F	Pr>F	Pr>F
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	0.0001 *	0.0013 *	<.0001 *
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0068 *	<.0001 *	0.0145 *
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	0.0052 *	<.0001 *	0.0062 *
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	0.0793	0.0043 *	0.1740
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0004 *	0.0012 *	0.3257
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.1992	0.0005 *	0.0092 *
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	0.1197	0.5573	0.1886
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	0.0927	0.9769	<.0001 *
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0625	0.7220	0.0010 *

Tratamientos: AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.2 Número de hojas y área foliar

Después de 13 días de tratamiento, las plantas de lechuga presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en número de hojas, urea 25% y nanofertilizante-urea al 25% evidenciaron el mayor número de hojas (12.7 y 12.9, respectivamente) y estadísticamente diferente a cuatro tratamientos (AD, NPA, NPAE, NU50% y NU25%E) (**Cuadro 3.6**). El crecimiento en hojas dicotiledóneas se caracteriza por un patrón complejo de división celular y alargamiento celular en la lámina foliar, la organización temporal y espacial del crecimiento causa gradientes en la densidad celular, el tamaño celular y la actividad mitótica. En investigaciones anteriores se observó que la fertilización con alta concentración de N aumentó la división de las células del mesófilo. La relación entre células del mesófilo y células epidérmicas también aumentó con la

fertilización con N, lo que indica que el N tuvo mayor influencia sobre las células del mesófilo. Un mayor suministro de nitrógeno mejora la ramificación apical, lo que significa que se forman más hojas por planta, lo cual coincide con los resultados de la presente investigación, donde se observó que en los tratamientos con fuente de N el número de hojas aumentó (Vos *et al.*, 2005; Roggatz *et al.*, 1999).

Cuadro 3.6 Número de hojas y área foliar de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

Tratamiento	Número de hojas	Área foliar (cm ²)
AD	10.0 b	376.8 c
NPA	10.1 b	372.0 c
NPAε	10.2 b	379.2 c
U25%	12.7 a	397.0 bc
U50%	11.2 ab	378.4 c
NU25%	12.9 a	414.8 ab
NU50%	10.1 b	394.4 bc
NU25%ε	10.6 b	396.4 bc
NU50%ε	12.0 ab	425.4 a

Medias ± DE con letra distinta en cada columna indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAC;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%ε.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%ε.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

De manera similar el área foliar mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, nanofertilizante-urea al 25% y nanofertilizante-urea al 50% con enzima tuvieron los mayores valores (414.8 y 425.4 cm²) y diferencia estadística al resto de los tratamientos (**Cuadro 3.6**). De la misma manera la fertilización con N aumenta la tasa de elongación celular (MacAdam *et al.*, 1989). Vos y Van der Putten (1998) realizaron

estudios en papa, observaron que con la limitación de N, las hojas de la papa reducen el tamaño de la hoja madura hasta tal punto que se logra el mantenimiento de la concentración de N y la capacidad fotosintética por unidad de área foliar. La "disminución del tamaño de la hoja" se logra mediante una tasa reducida de expansión foliar identificando un efecto del N sobre la tasa de división celular o sobre el tamaño celular como posibles mecanismos.

En el **Cuadro 3.7** se observa, para número de hojas, diferencia estadística significativa únicamente en el contraste del grupo de tratamientos testigos (AD, NPA, NPAE) con los tratamientos de urea convencional (U25%, U50%). Por el contrario, en área foliar, el contraste entre los tratamientos testigos (AD, NPA, NPAE) con los tratamientos de urea convencional (U25%, U50%) fue el único que no presentó diferencia significativa.

Cuadro 3.7 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para de numero de hoja y área foliar de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No.	Tratamientos comparados	Número de hojas	Área foliar
		Pr>F	Pr>F
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	0.0216 *	0.1926
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0883	0.0001 *
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	0.0528	0.0019 *
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	0.3594	0.0005 *
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0842	0.0069 *
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.2513	0.0005 *
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	0.4881	0.0885
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	0.3412	0.0215 *
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.3425	0.0218 *

Tratamientos: **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAE;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%E.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%E.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.3 Biomasa fresca

Para la determinación de biomasa fresca se realizaron dos muestreos (9 y 13 días de tratamiento). En el primer muestreo (a los 9 días de tratamiento), las hojas de lechuga presentaron diferencias estadísticas significativas entre dos de los tratamientos evaluados en biomasa fresca. La media de mayor valor se mostró con el tratamiento nanofertilizante-urea al 25% (10.46 g) y diferente estadísticamente al tratamiento de nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima, el cual mostró la menor media (**Figura 3.3A**). En el segundo muestreo (13 días) el tratamiento con nanofertilizante-urea al 25% presentó la mayor biomasa fresca en las hojas de lechuga (15.6 g) y mostró diferencia estadística significativa con 5 tratamientos (AD, NPA, NPA ϵ , U50% y NU50%) (**Figura 3.3A**). La biomasa fresca de raíz de las plantas de lechuga, a los 9 días de tratamiento, presentaron diferencia estadística significativa, el tratamiento urea 25% evidenció el mayor valor de biomasa fresca de raíz (9.8 g) y fue estadísticamente diferente a tres tratamientos (NPA, NPA ϵ y NU50% ϵ) (**Figura 3.3B**). A los 13 días, los tratamientos urea 25%, urea 50% y nanofertilizante-urea al 25% presentaron los valores mayores en biomasa fresca de raíz (13.96, 13.36 y 13.54 g respectivamente) y fueron estadísticamente diferentes a cuatro tratamientos (AD, NPA, NPA ϵ y NU50% ϵ) (**Figura 3.3B**).

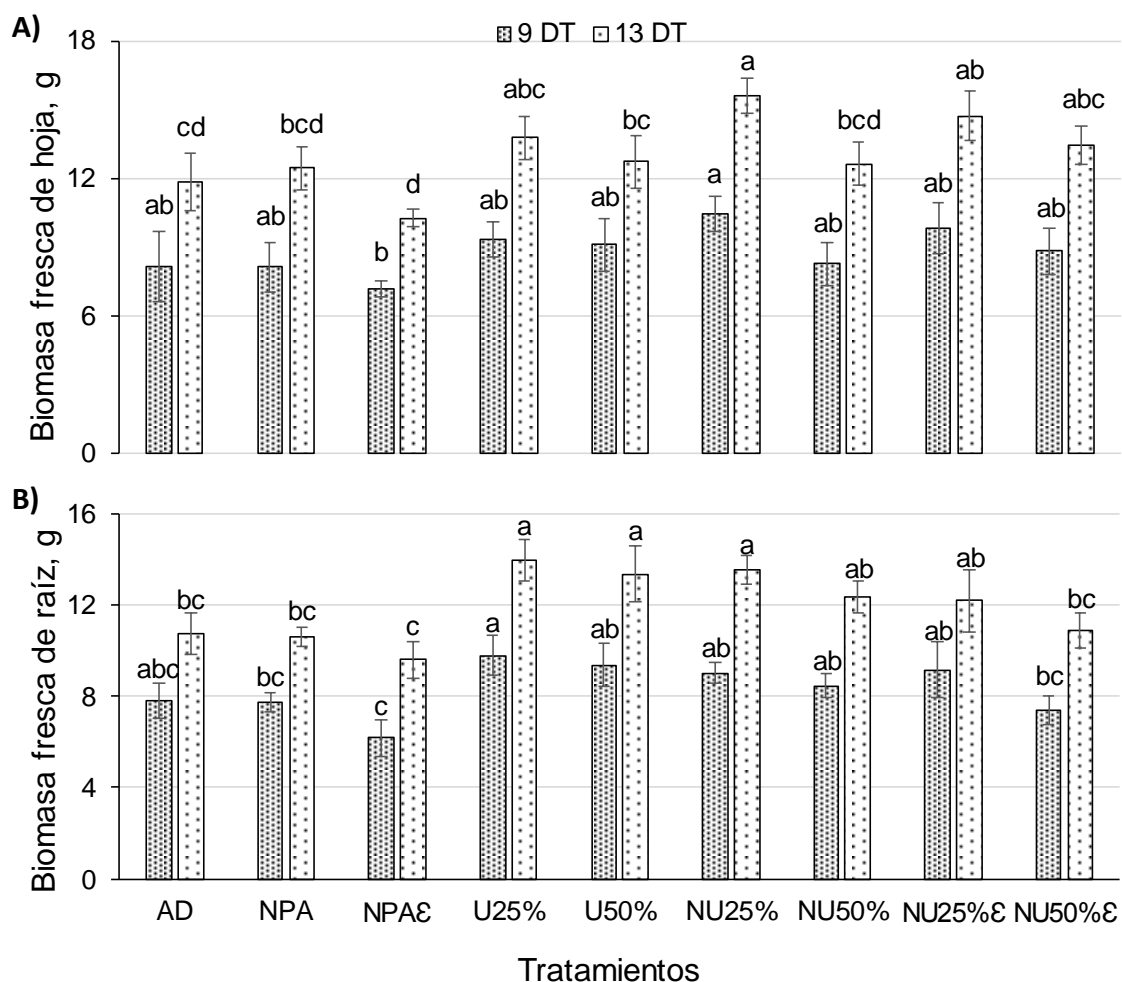


Figura 3.3 Biomasa fresca de hoja y raíz en planta de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAε; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%ε. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%ε. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

La biomasa fresca en hoja de lechuga, muestra diferencia significativa en los contrastes de los grupos de tratamientos testigos con tratamientos con alguna fuente de nitrógeno, mientras que en los contrastes de los tratamientos testigos y nano-urea 50%, con y sin enzima, así como los tratamientos con urea convencional comparado con los tratamientos de nano-urea no mostraron diferencia estadística significativa (**Cuadro 3.8**).

Esta diferencia en la acumulación de biomasa fresca podría ser el reflejo de las diferentes fuentes de N, como resultado de la absorción y asimilación del N disponible (Mérigout *et al.*, 2008).

Cuadro 3.8 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para biomasa fresca de hoja y raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa

No.	Tratamientos comparados	Biomasa hoja		Biomasa raíz	
		Pr>F	*	Pr>F	*
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	0.0304	*	<.0001	*
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0003	*	0.0033	*
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	<.0001	*	0.0014	*
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	0.0566		0.0814	
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0227	*	0.0986	
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0006	*	0.0041	*
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	0.3233		0.3900	
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	0.3347		0.0120	*
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.2607		0.0497	*

Tratamientos: AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.4 Biomasa seca

Se realizaron dos muestreos para determinar el peso de biomasa seca, a los 9 y 13 días, en ambos muestreos las plantas de lechuga mostraron diferencia estadística significativa en peso de biomasa seca tanto de hoja como de raíz (**Figura 3.4A y B**). En hoja, en el primer muestreo, 9 días, el tratamiento nanofertilizante-urea al 25% con enzima fue el que presentó el mayor peso (2.12 g) y fue diferente estadísticamente con cinco tratamientos (AD, NPA, NPA ϵ , U50% y NU50% ϵ) (**Figura 3.4A**). En el segundo muestreo (13 días), repetidamente el tratamiento con nanofertilizante-urea al 25% con enzima fue el que mostró la mayor biomasa seca en las hojas de lechuga (3.1 g) y estadísticamente diferente a cuatro tratamientos (AD, NPA, NPA ϵ y U25%) (**Figura 3.4A**). En raíz, en el primer muestreo, 9 días, similar a los resultados de biomasa seca en hoja, el tratamiento nanofertilizante-urea al 25% con enzima fue el que evidenció el mayor valor de peso seco de raíz (1.96 g) y fue diferente estadísticamente a cuatro tratamientos (AD, NPA, NPA ϵ y NU25%) (**Figura 3.4B**). Mientras que, en el segundo muestreo, 13 días, tres tratamientos fueron los que tuvieron los valores más altos, nanofertilizante-urea al 50%, nanofertilizante-urea al 25% con enzima y nanofertilizante-urea al 50% con enzima (2.94, 2.91 y 2.88 g) y diferente estadísticamente a cuatro tratamientos (AD, NPA, NPA ϵ y U25%) (**Figura 3.4B**).

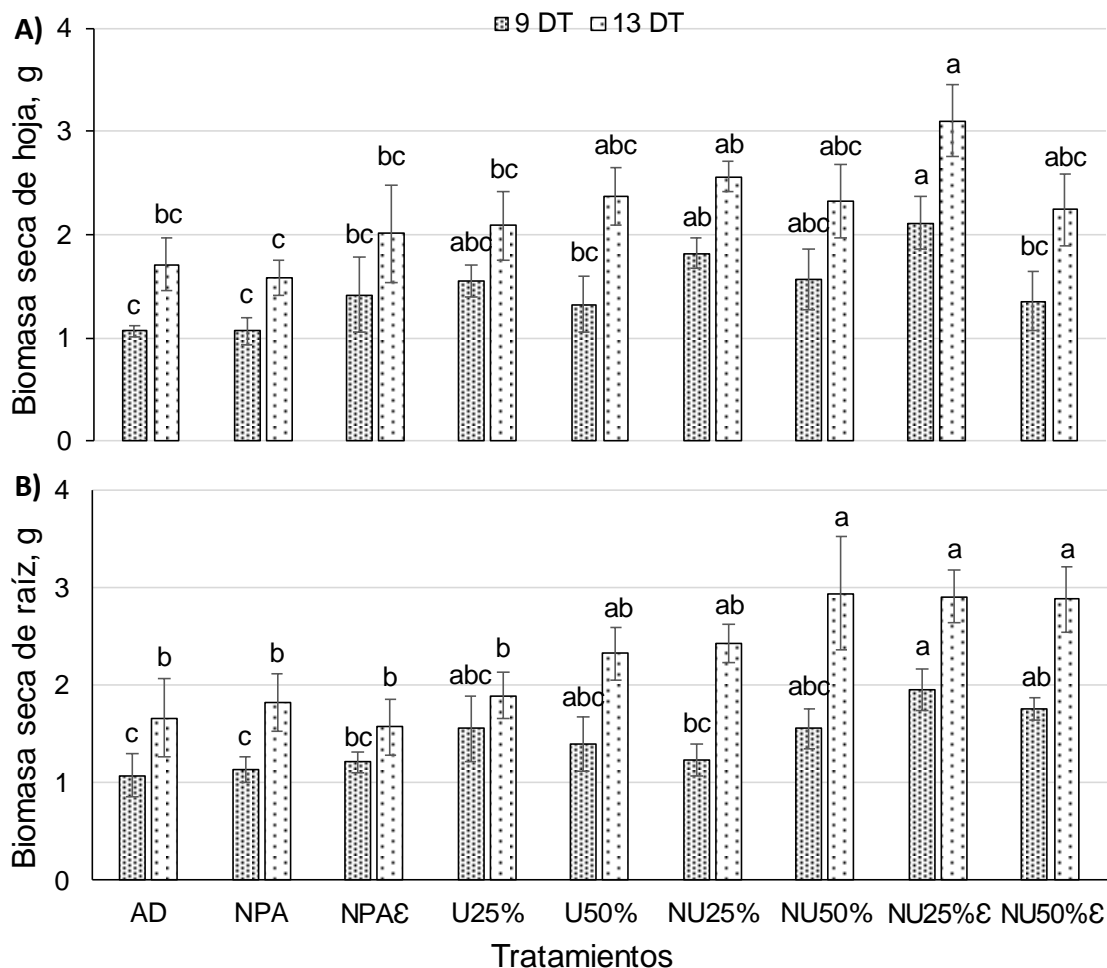


Figura 3.4 Biomasa seca de hoja y raíz en planta de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAE;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%E.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%E.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

En el **Cuadro 3.9** se muestra que la biomasa seca de hoja y raíz, presentan diferencia estadística significativa en los contrastes de los tratamientos testigos con los tratamientos de nano-urea en ambas concentraciones con y sin enzima. Cuando el contraste es con los tratamientos testigos y tratamientos con urea convencional, así como los contrastes de los tratamientos de urea convencional con los tratamientos de nano-urea no

mostraron diferencia estadística significativa. La producción de biomasa seca es el resultado de la acumulación y la distribución de fotosintatos en diferentes órganos de la planta, que está influenciada significativamente por la administración y absorción de N (Deng *et al.*, 2015). Aunque no se mostraron diferencias estadísticas significativa en los tratamientos que contenían alguna fuente de N (**Figura 3.4**), se observa que las plantas tratadas con nano-urea presentaron mayor acumulación de biomasa, por lo que se deduce que hubo una mayor absorción de N, por lo tanto, mejoró la asimilación de fotosintatos.

Cuadro 3.9 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para biomasa seca de hoja y raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No.	Tratamientos comparados	Biomasa hoja		Biomasa raíz	
		Pr>F		Pr>F	
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	0.1172		0.1766	
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0027	*	0.0009	*
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	0.0009	*	0.0366	*
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	0.0814	*	0.0004	*
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0232	*	0.0152	*
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0090	*	0.0032	*
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	0.4996		0.4369	
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	0.1716		0.0266	*
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.2383		0.0815	

Tratamientos: AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.5 Lecturas SPAD

La lectura de SPAD es un índice relativo de clorofila, la cual es altamente correlacionada con el contenido de clorofila en hoja obtenido por métodos destructivos (Mirassón *et al.*, 2010). Los valores SPAD obtenidos de la plantas de lechuga bajo diferentes condiciones de N, mostraron diferencias estadísticas significativas, siendo las plantas de los tratamientos nanofertilizante-urea al 50 % (35.50) y nanofertilizante-urea al 50 % con enzima (35.09) en las que se obtuvieron los mayores valores, mientras que las plantas de los tratamientos: agua destilada (26.43); nanopartículas de alginato sin carga de urea (25.15) y nanopartículas de alginato sin carga de urea con adición de enzima (25.23) en las que estadísticamente se presentaron los valores SPAD más bajos, existiendo una diferencia de 39.51 % entre ambos grupos de tratamientos (**Figura 3.5**).

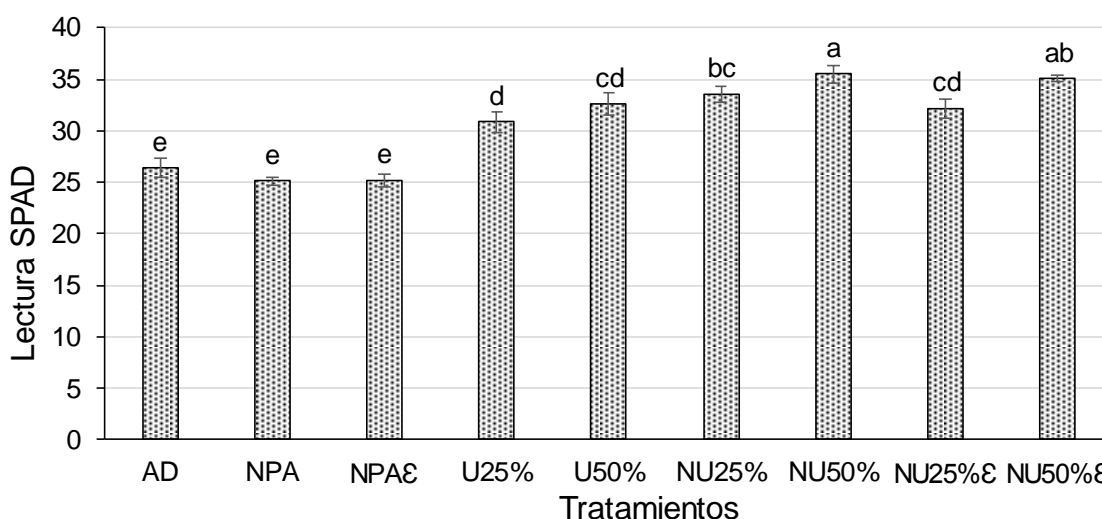


Figura 3.5 Lecturas SPAD en hojas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias ± DE con letra distinta indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAε;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.**

nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ** . nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ** . nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

Es de notar que en los tratamientos donde el N estuvo presente, las lecturas SPAD fueron significativamente mayores a aquellas de los tratamientos control. Asimismo, los valores SPAD también se incrementaron al aumentar la concentración de N de 25 a 50% en los tratamientos respectivos. (**Figura 3.5**). En los contrastes se observa diferencia estadística significativa en todas las comparaciones entre testigos, urea convencional y nano-urea (**Cuadro 3.10**).

Cuadro 3.10 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para lecturas SPAD en hoja de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No.	Tratamientos comparados	SPAD	
		Pr	>F
1	(AD, NPA, NPA ϵ) vs (U25%, U50%)	<.0001	*
2	(AD, NPA, NPA ϵ) vs (NU25%, NU50%, NU25% ϵ , NU50% ϵ)	<.0001	*
3	(AD, NPA, NPA ϵ) vs (NU25%, NU25% ϵ)	<.0001	*
4	(AD, NPA, NPA ϵ) vs (NU50%, NU50% ϵ)	<.0001	*
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25% ϵ , NU50% ϵ)	<.0001	*
6	(NPA, NPA ϵ) vs (NU25%, NU50%, NU25% ϵ , NU50% ϵ)	<.0001	*
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	<.0001	*
8	(U25%, U50%) vs (NU25% ϵ , NU50% ϵ)	0.0015	*
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25% ϵ , NU50% ϵ)	<.0001	*

Tratamientos: AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPA ϵ ; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25% ϵ . nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50% ϵ . nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.6 Cuantificación de fenoles totales en hoja

La mayor concentración de fenoles totales en hoja de lechuga se encontró en las plantas del tratamiento nanofertilizante-urea al 25 % (31.52 mg EAG g⁻¹ materia seca), seguido por las plantas de los tratamientos urea 25 % (27.99 mg EAG g⁻¹ materia seca) y nanopartículas sin carga de urea con adición de enzima (27.83 mg EAG g⁻¹ materia seca) mientras que las menores concentraciones se obtuvieron en plantas de dos tratamientos que resultaron ser iguales estadísticamente, nanopartículas de alginato sin carga de urea (17.99 mg EAG g⁻¹ materia seca) y nanofertilizante-urea al 50 % con enzima (16.54 mg EAG g⁻¹ materia seca), se notó una diferencia de 90.6% entre los tratamientos con el mayor y menor valor de fenoles totales.

Los valores de fenoles totales obtenidos (16.54–31.52 mg EAG g⁻¹ materia seca) se encuentran en el mismo orden de magnitud a valores reportados previamente por Liu *et al.* (2007). La **Figura 3.6** muestra una disminución en el contenido fenólico total al aumentar la concentración de N en todos los tratamientos donde dicho elemento estuvo presente. Estos resultados usándose pueden explicar la teoría del balance crecimiento-diferenciación, la cual predice el balance de la asignación de recursos a procesos relacionados con la diferenciación y con el crecimiento en una amplia variedad de condiciones ambientales. En este sentido, cuando las condiciones ambientales son buenas y los niveles de nitrógeno son adecuados, dicha teoría especifica que el crecimiento de la planta será favorecido con la producción de proteínas fotosintéticas como prioridad. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son desfavorables y la disponibilidad de nutrientes (tal como nitrógeno) limitada, la teoría propone que el

crecimiento de la planta disminuirá, mientras que la producción de metabolitos secundarios, que pueden ayudar en el almacenamiento y defensa, se incrementa subsecuentemente.

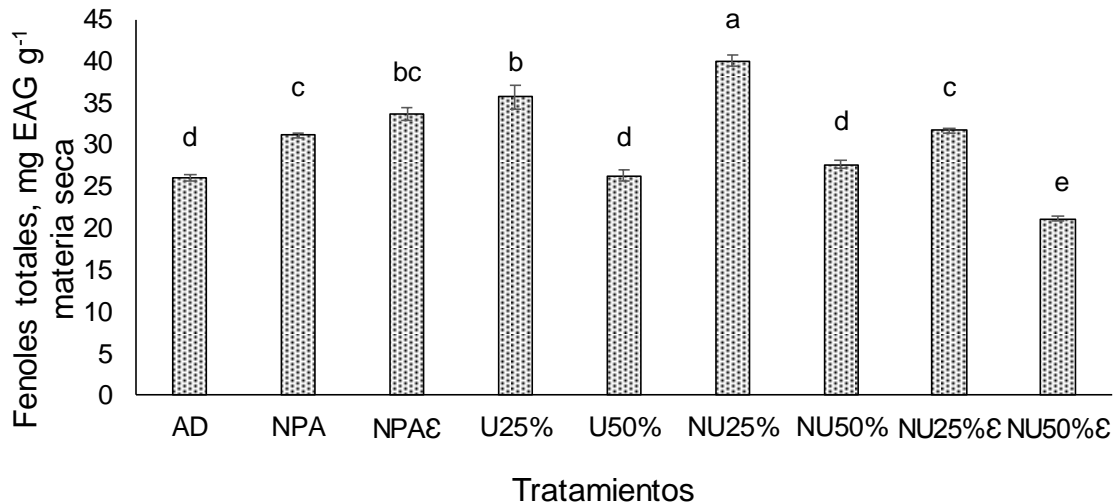


Figura 3.6 Contenido de fenoles totales en hojas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAε;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%ε.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%ε.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.7 Concentraciones de macronutrientes en vástago.

La concentración de macronutrientes en vástago de lechuga mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. A los 9 y 13 días de tratamiento, la mayor concentración de N se observó en plantas tratadas con nanofertilizante-urea al 50% con enzima, con 13.39 y 13.04 g kg⁻¹, respectivamente para cada fecha de muestreo, fueron diferentes estadísticamente a cuatro tratamientos que contenían N (U25%, U50%, NU25% y NU25% ϵ) y, como era esperado, a los tratamientos testigo (AD, NPA y NPA ϵ) (**Figura 3.8A**). En el **Cuadro 3.11** se observa que existe diferencia estadística significativa en todas las comparaciones entre los grupos de los tratamientos testigos, urea convencional y nano-urea, lo cual nos indica un efecto entre aplicar o no alguna fuente de N y diferencia entre aplicar urea convencional o nano-urea como fuente de N.

Du *et al.* (2017) mencionan que existen dos vías confirmadas para la captación y translocación de las nanopartículas en las plantas mediante: raíz y hoja. Los estudios realizados a través de vía raíz se han llevado a cabo bajo cultivos hidropónicos y en suelo. Las nanopartículas pueden ser absorbidas por la endodermis mediante canales, proteínas transportadoras y/o endocitosis posteriormente estas son trasladadas por la ruta apoplástica y luego transferidas al cilindro vascular a través de la ruta simplástica (Pérez-de-Luque, 2017). A lo anteriormente descrito, en este estudio podemos aseverar la absorción del nanofertilizante-urea ya que, de acuerdo a los resultados agronómicos, bioquímicos y nutrimentales, las plantas tratadas con nanofertilizante-urea en ambas concentraciones evidencian su efecto. Para confirmar lo anterior en la **Figura 3.7** se

muestran micrografías de Microscopio Electrónico de Barrido, donde se observa la presencia de nano-urea dentro de la planta de lechuga.

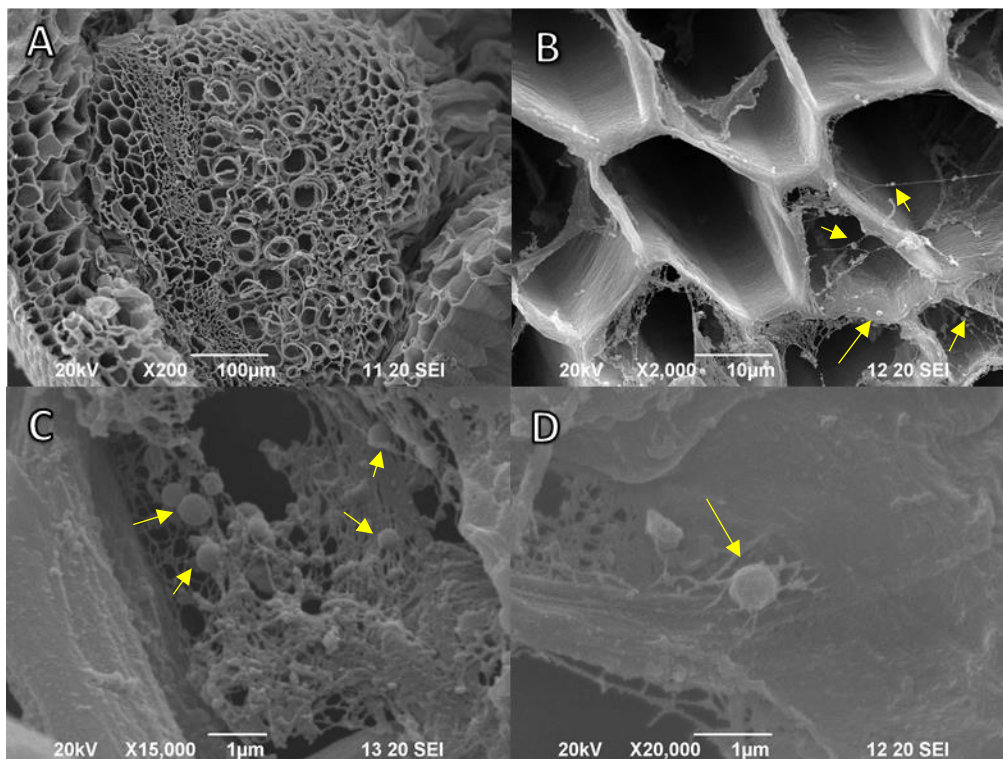


Figura 3.7 Micrografías de Microscopia Electrónica de Barrido. A) corte transversal de nervadura de la hoja de lechuga, B, C y D) nano partículas cargadas de urea en la parte interna de la nervadura.

La concentración de P, mostró diferencia estadística significativa, a los 9 días de tratamiento. El tratamiento con nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima fue el que presentó mayor media estadística (2.12 g kg^{-1}) y tuvo diferencia estadística únicamente con el tratamiento de nanofertilizante-urea al 50% con enzima; tras 13 días de tratamiento, las plantas tratadas con agua destilada, nanopartículas de alginato sin carga de urea y nanofertilizante-urea al 25% fueron las que presentaron mayor concentración de P en vástago (1.79 , 1.84 y 1.63 g kg^{-1}) y fueron estadísticamente diferentes únicamente a dos tratamientos (U50% y NU50%) (**Figura 3.8B**).

En K, no se observaron diferencias estadísticas significativas en alguno de los muestreos realizados (9 y 13 días después de tratamiento). (**Figura 3.8C**)

Cuadro 3.11 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para concentración de N en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No.	Tratamientos contrastados	Pr>F	*
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	<.0001	*
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	<.0001	*
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	<.0001	*
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	0.0027	*
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	0.0091	*
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0013	*

Tratamientos: **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAE;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%E.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%E.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

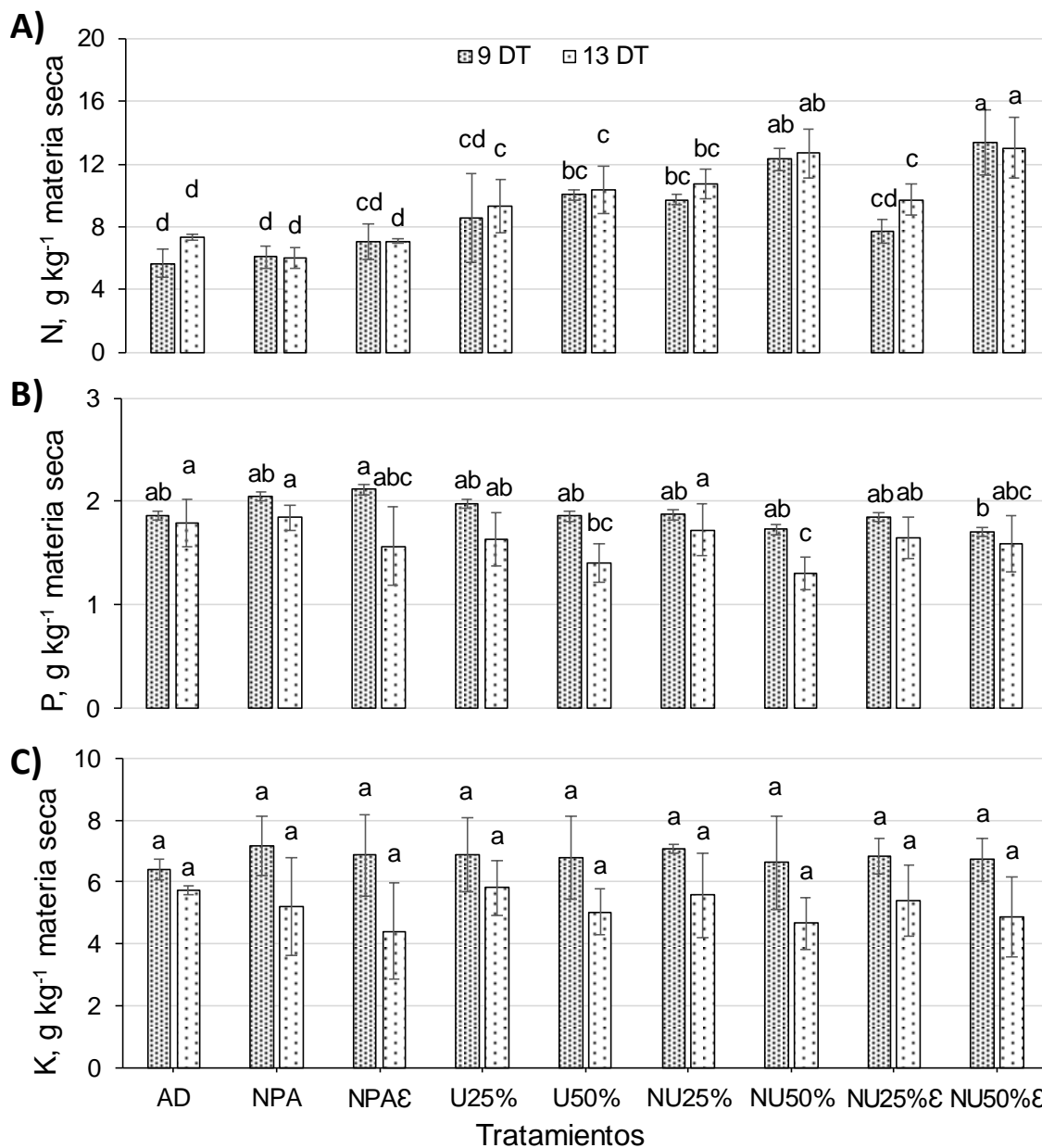


Figura 3.8 Concentración de macronutrientes de N, P y K en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAε; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%ε. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%ε. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

Se observó que la concentración de Ca en vástago presentó diferencia estadística significativa entre tratamientos; a los 9 días las mayores concentraciones se presentaron en los tratamientos de urea 25% y urea 50% (3.4 y 3.5 g kg⁻¹, respectivamente) y fueron diferentes estadísticamente con cinco tratamientos (AD, NPA, NU50%, NU25% ϵ y NU50% ϵ). Después de 13 días de tratamiento, los vástagos de las plantas de lechuga mostraron la media más alta en el tratamiento con nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima (3.2 g kg⁻¹) y tuvo diferencia estadística con tres tratamientos (NPA, NU50% y NU50% ϵ) (**Figura 3.9A**).

Por último, la concentración de Mg mostró diferencia estadística significativa. A los 9 días de tratamiento, las plantas que se trataron con nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima, urea 25% y urea 50% (2.12, 2.09 y 2.22 g kg⁻¹ respectivamente) se mostraron estadísticamente diferentes a tres tratamientos (NU50%, NU25% ϵ y NU50% ϵ). Tras 13 días de tratamiento, el vástago de las plantas tratadas con urea 25% fue superior (2.0 g kg⁻¹) y estadísticamente diferente a dos tratamientos (NU50% y NU50% ϵ) (**Figura 3.9B**).

Es conocido que la forma iónica y la concentración del N aplicado juegan un papel importante en la composición química de las plantas (Troelstra *et al.*, 1995). El nitrógeno de la urea sólo es accesible para su asimilación después de hidrólisis en amoníaco y dióxido de carbono, por acción de la ureasa, por otro lado, muchos informes concluyeron que plantas fertilizadas con NH⁴⁺ conducen a una depresión foliar de concentraciones de K, Ca y Mg (Borgognone *et al.*, 2013; Na *et al.*, 2014). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, como se observa en la figura 3.7A y B, cuando se

aplica una mayor concentración de cualquier fuente de N, la concentración de Ca y Mg disminuye notablemente.

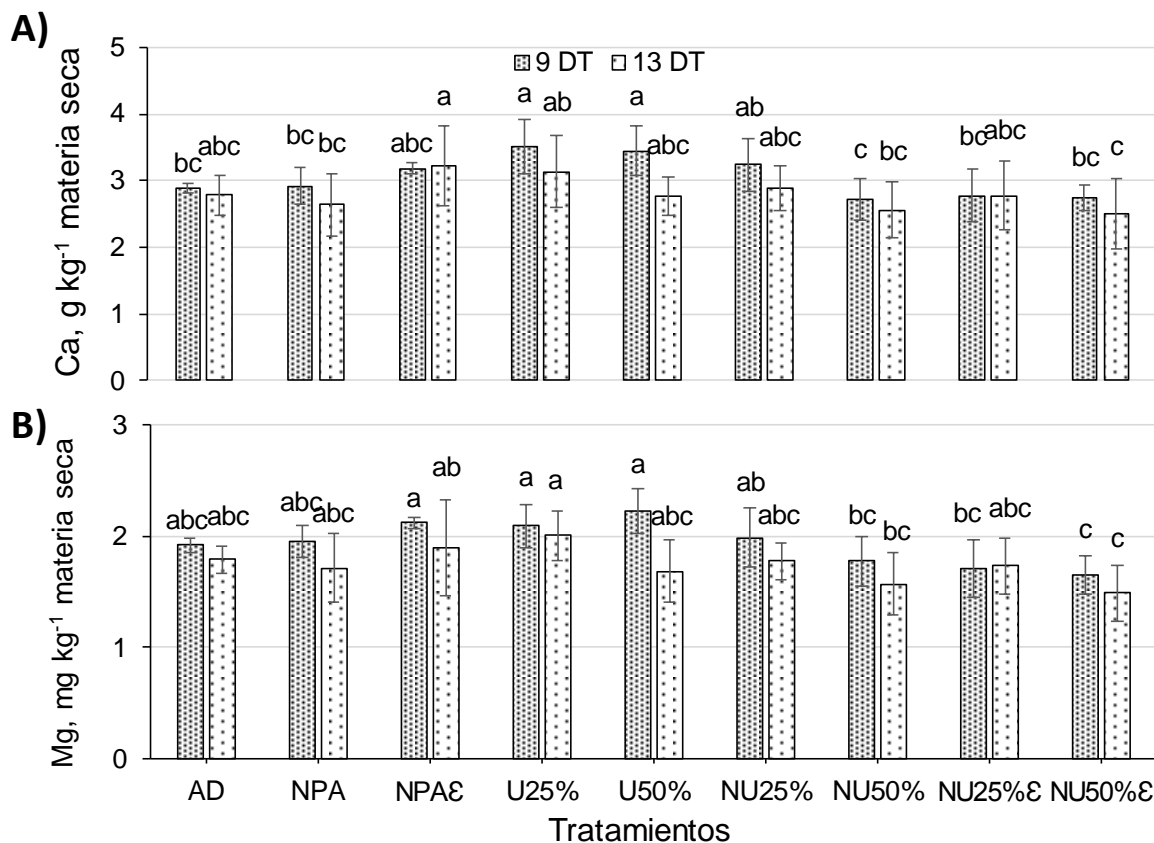


Figura 3.9 Concentración de macronutrientes de Ca y Mg en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAE;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%E.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%E.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.8 Acumulación de macronutrientos en vástago.

La acumulación de macronutrientos en vástago de plantas de lechuga presentó diferencias estadísticas significativas. En N, a los 9 días de tratamiento los vástagos de las plantas tratadas a concentración de 50% bajo cualquier fuente de N evaluadas, presentaron la mayor acumulación del macronutriente (5.4, 5.3 y 5.6 mg) y fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos testigos (AD, NPA y NPAE) y al tratamiento de nanofertilizante-urea al 25% con enzima. Mientras tanto que, a los 13 días de tratamiento, los vástagos de las plantas tratadas con nanofertilizante-urea al 50% mostraron el mayor valor medio (8.8 mg) que fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos testigos (AD, NPA y NPAE) y a cuatro tratamientos que contenían alguna fuente de N (U25%, U50%, NU25% y NU25%E) (**Figura 3.10A**).

Así mismo, en el **Cuadro 3.12** destaca que existe diferencia estadística significativa en los contrastes de los grupos de tratamientos testigos con los grupos de tratamientos con alguna fuente de N, el contraste de urea convencional con nano-urea en ambas concentraciones sin adición de enzima también evidenció diferencia estadística significativa.

La absorción pasiva está mediada por algunos de los principales miembros de la familia de acuaporinas, de las cuales, una familia de acuaporinas se encarga del transporte de urea a través de la membrana plasmática y otra familia se encarga del transporte de la urea en tonoplasto o en la membrana mitocondrial. La arginina es una importante forma de almacenamiento de N y es catalizada durante la removilización de N del tejido de origen o durante la senescencia. El catabolismo de arginina tiene lugar en la mitocondria

y produce urea, que es transportada al citosol, allí, la urea se hidroliza en amonio, que luego es reasimilada (Marschner, 2011).

Cuadro 3.12 Probabilidad de error ($P \leq 0.05$) según contraste para acumulación de N en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No.	Tratamientos contrastados	Pr>F	
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	0.0207	*
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0005	*
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	0.0186	*
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	<.0001	*
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0323	*
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0017	*
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	0.0395	*
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	0.8048	
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.1693	

Tratamientos: AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

En la primera determinación (9 días de tratamiento) de acumulación P en el vástago de las plantas de lechuga, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Sin embargo, en la segunda determinación (13 días de tratamiento) si se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, el vástago de las plantas tratadas con nanopartículas de alginato sin carga de urea fue el que mostró el mayor valor (1.4 mg) y fue estadísticamente diferente a cuatro tratamientos (NPAE, U50%, NU50% y NU50%E) (Figura 3.10B).

En la acumulación de K, a los 9 días de tratamiento, las plantas en condiciones con nanofertilizante-urea al 25% con enzima presentaron el mayor valor (4 mg) y fue estadísticamente diferente a un solo tratamiento (NPAE). A los 13 días de tratamiento,

cuatro tratamientos (AD, NPA, U25% y NU25%) fueron diferentes estadísticamente a las plantas tratadas con nanofertilizante-urea al 50% con enzima. (**Figura 3.10C**).

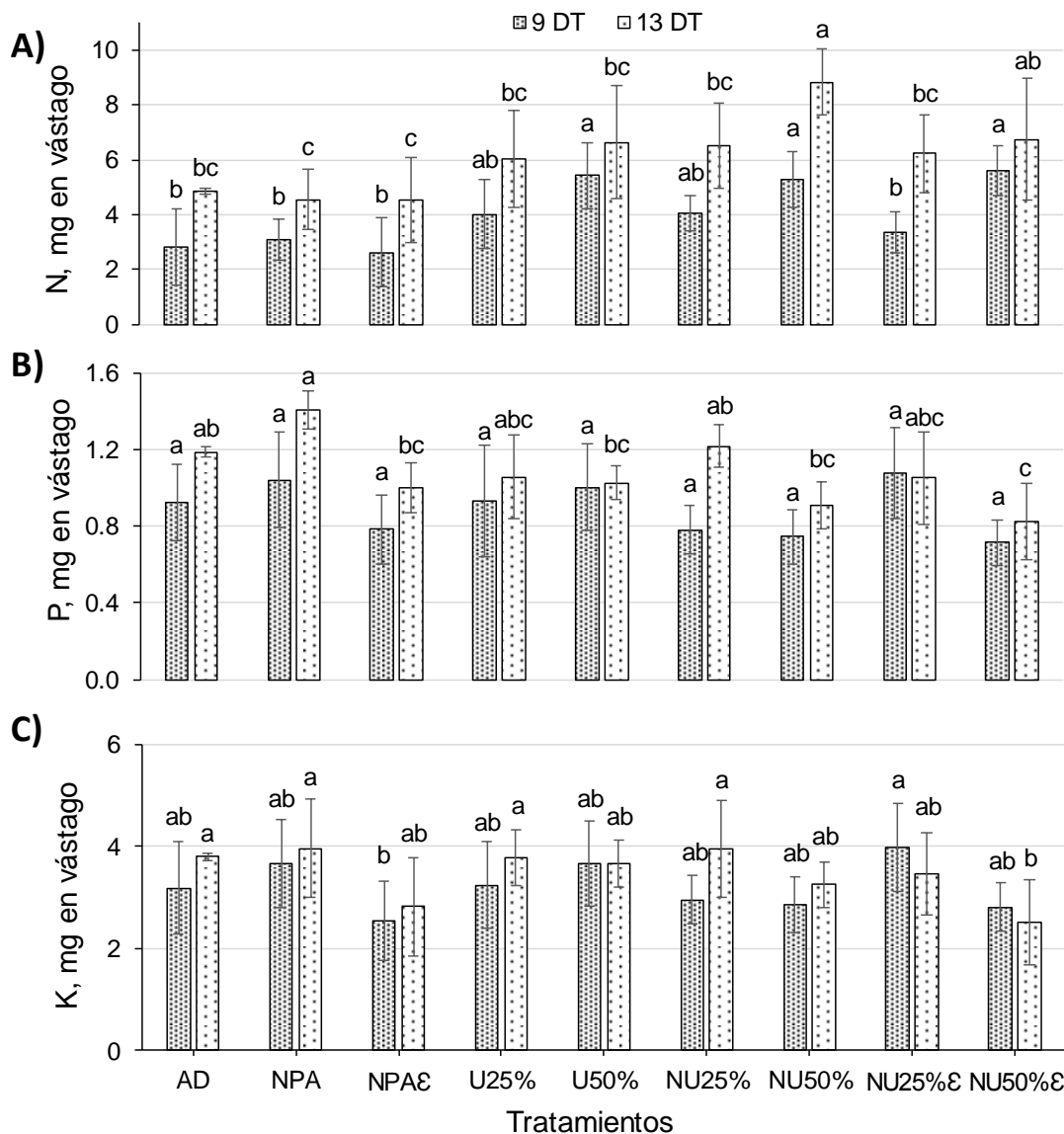


Figura 3.10 Acumulación de macronutrientes de N, P y K en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAε; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%ε. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%ε. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

La acumulación de Ca y Mg, a los 9 días de tratamiento, en los vástagos de las plantas tratadas con urea 50% presentaron los mayores valores promedios y fueron estadísticamente diferentes a tres tratamientos (NPA ϵ , NU50% y NU50% ϵ) (**Figura 3.11A y B**). También a los 13 días de tratamientos se evidenciaron diferencias significativas. Con el Ca, los tratamientos de nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima, nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima, urea 25%, urea 50% y nanofertilizante-urea al 25% fueron estadísticamente diferentes únicamente a un tratamiento (NU50% ϵ) (**Figura 3.11A**). En cuanto a Mg, los tratamientos de nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima, urea 25% y nanofertilizante-urea al 25% fueron superiores y estadísticamente diferentes a nanofertilizante-urea al 50% con enzima en la acumulación del elemento (**Figura 3.11B**).

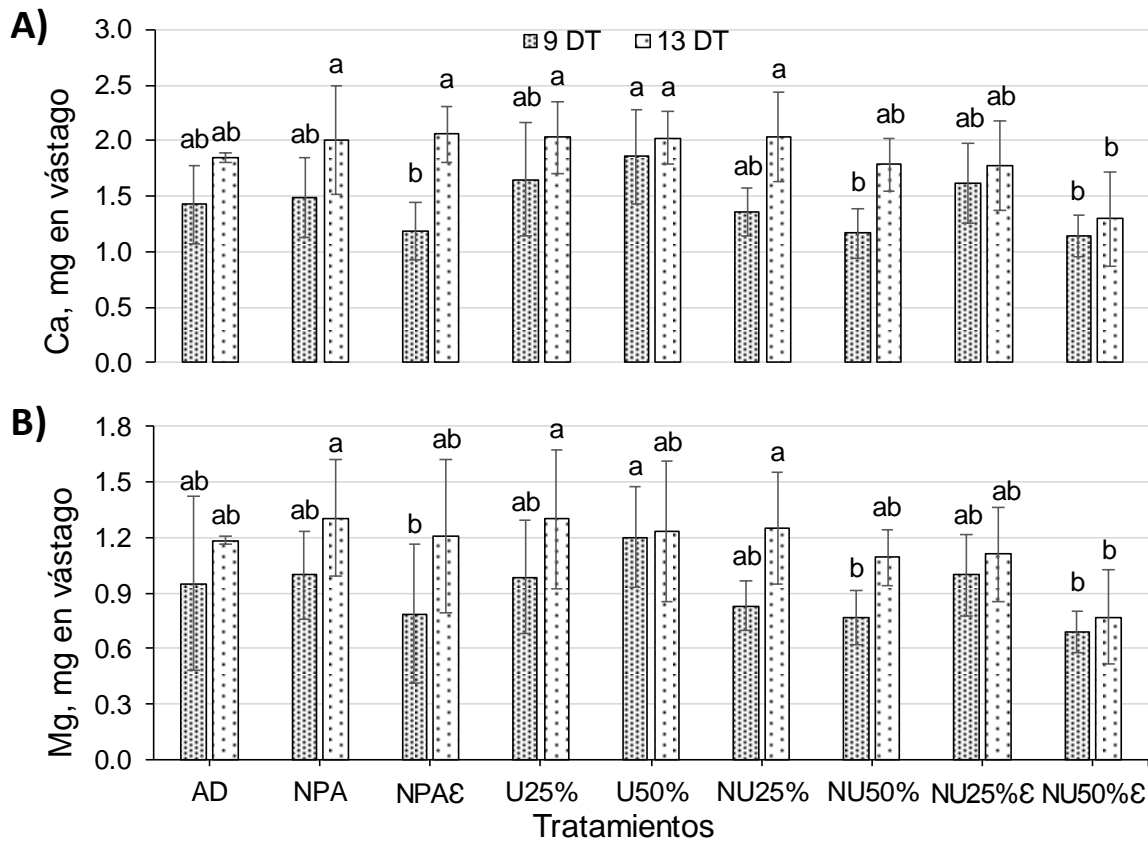


Figura 3.11 Acumulación de macronutrientos de Ca y Mg en vástago de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPAε;** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25%ε.** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50%ε.** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.9 Concentraciones de macronutrientes en raíz.

La concentración de macronutrientes en raíces de plantas de lechuga presentó diferencia estadística significativa entre tratamientos. Después de 9 días de tratamiento, las plantas tratadas con nanofertilizante-urea al 50% evidenciaron mayor concentración de N (13.1 g kg^{-1}) en raíz y fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos testigos (AD, NPA y NPAE) y a tres tratamientos que contenían alguna forma de N (U25%, U50% y NU25%E). A los 13 días de tratamiento, las plantas tratadas con nanofertilizante-urea al 50% con enzima exhibieron el mayor valor (16.1 g kg^{-1}) y fue estadísticamente diferente a los tratamientos testigos (AD, NPA y NPAE) y a cuatro tratamientos que contenían fuente de N (U25%, U50%, NU25% y NU25%E) (**Figura 3.12A**).

En todos los contrastes entre los grupos de los tratamientos testigos, urea convencional y nano-urea realizados se muestran diferencias estadísticas significativas en la concentración de N de raíces de lechuga (**Cuadro 3.13**).

Cuadro 3.13 Probabilidad de error (significancia) según contraste para concentración de N en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No.	Tratamientos contrastados	Pr>F	*
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	0.0490	*
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	0.0004	*
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	<.0001	*
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0005	*
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	0.0016	*
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*

Tratamientos: AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

Los resultados de los contrastes muestran el efecto de la absorción de nanopartículas con carga de urea mediante la raíz, lo cual dicha absorción fue corroborada en la observación de cortes de raíz en el Microscopio Electrónico de Barrido. En la **Figura 3.12** se muestran los cortes de raíces de plantas tratadas con nanopartículas cargadas con urea. Aun no se tiene claro el mecanismo real en que las nanopartículas penetran a las células. *Cifuentes et al. 2010*, reportaron la penetración de nanopartículas de hierro recubiertas con carbono en cuatro cultivos (guisante, tomate, girasol y trigo), la respuesta de dicha internalización de las nanopartículas fue diferente en cada especie; en girasol se mostró una absorción de nanopartículas más lenta en comparación a los demás cultivos.

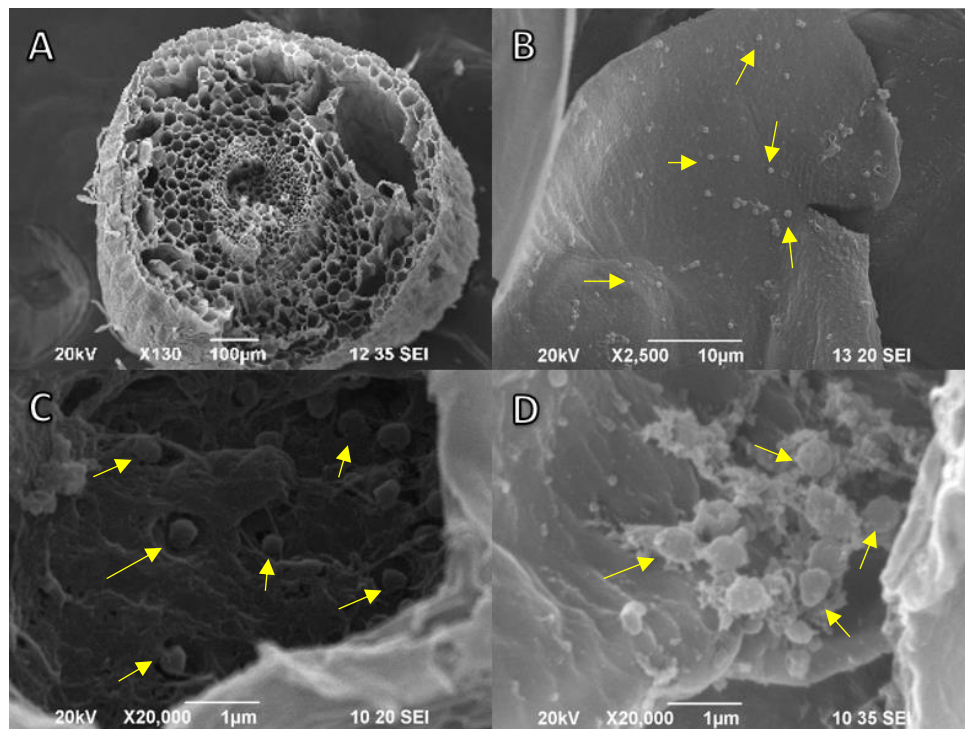


Figura 3.12 Micrografías de Microscopia Electrónica de Barrido. A) corte transversal de raíz de lechuga, B, C y D) nano partículas cargadas de urea en la parte interna de la raíz.

A los 9 días de tratamiento, la concentración de P en las raíces no se vio afectada bajo los diferentes tratamientos, es decir; no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Mientras que, a los 13 días de tratamiento, las plantas bajo condiciones de nanofertilizante-urea al 25% presentaron mayor valor de P (2.2 g kg^{-1}) y fueron diferentes estadísticamente a cuatro tratamientos (AD, NPA, U50% y NU50%) (**Figura 3.13B**).

Con relación al K, a los 9 días, se encontró que agua destilada fue el tratamiento en el que las plantas tuvieron la mayor concentración (6.1 g kg^{-1}) y fueron estadísticamente diferentes a las plantas de todos los tratamientos que tuvieron alguna forma de N (U25%, U50%, NU25%, NU25% ϵ , NU50% y NU50% ϵ). A los 13 días de tratamiento, las plantas abastecidas con nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima manifestaron el mayor valor medio (7.2 g kg^{-1}) y fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (**Figura 3.13C**).

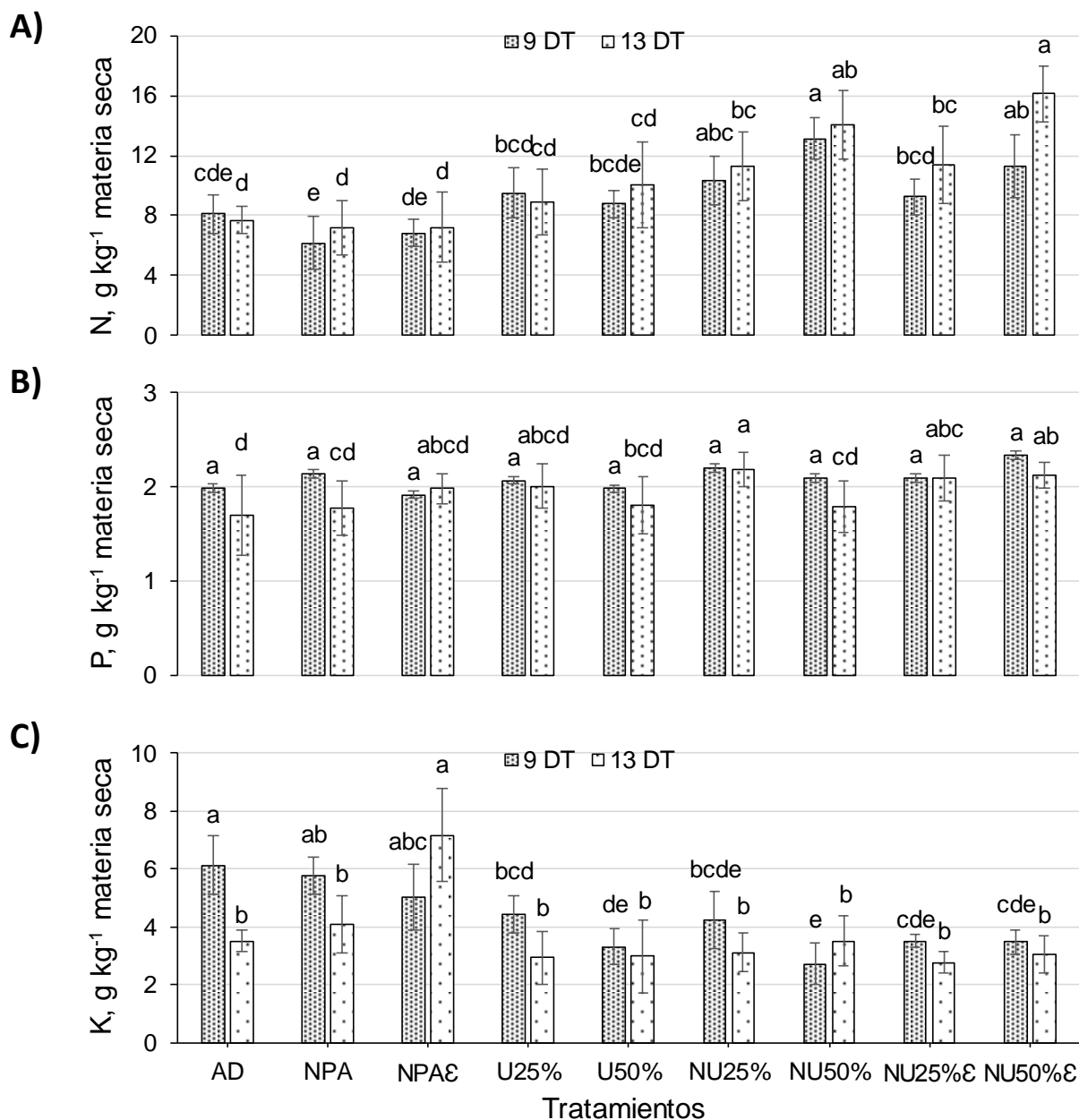


Figura 3.13 Concentración de macronutrientes de N, P y K en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAε; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%ε. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%ε. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

En cuanto a la concentración de Ca en las raíces de lechuga, después de 9 días de tratamiento, nanofertilizante-urea al 25% fue el que tuvo el mayor valor (2.2 g kg^{-1}) y tuvo diferencia estadística con un tratamiento testigo (AD) y dos tratamientos que contuvieron alguna fuente de N (NU50% y NU50% ϵ). Por el contrario, a los 13 días los tratamientos a concentración de 50% de nano-fertilizante con y sin enzima, fueron los que mostraron mayor concentración de Ca (2.4 g kg^{-1} , en ambos tratamientos) y fueron estadísticamente diferentes solo a las raíces de las plantas tratadas con nanopartículas de alginato sin carga de urea (**Figura 3.14A**).

En la concentración de Mg, a los 9 días de tratamiento, las raíces de las lechugas tratadas con agua destilada tuvieron la media estadística más alta (2.1 g kg^{-1}) y fueron diferentes estadísticamente a cuatro tratamientos (NPA ϵ , U25%, NU50% y NU50% ϵ). A los 13 días, el tratamiento de nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima mostró la mayor concentración del elemento (1.9 g kg^{-1}) y es estadísticamente diferente a cuatro tratamientos (AD, NPA, U50% y NU50%) (**Figura 3.14A**)

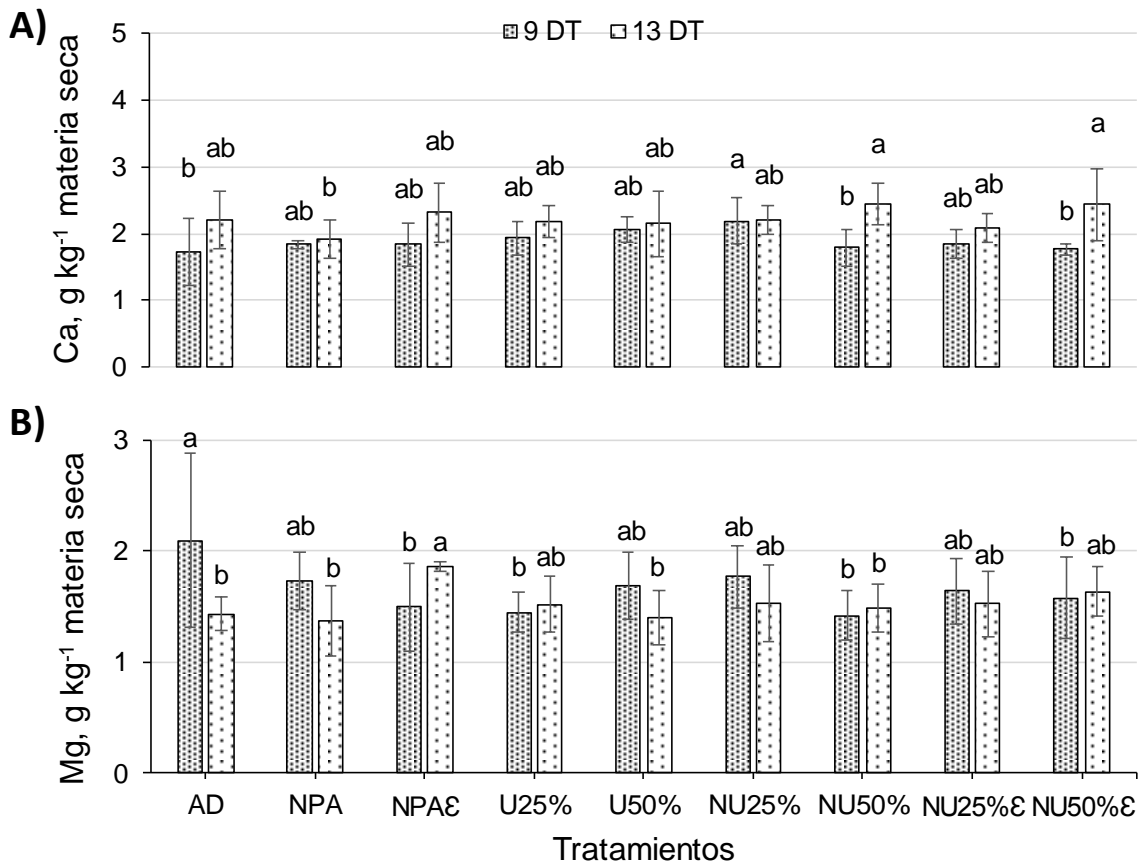


Figura 3.14 Concentración de macronutrientes de Ca y Mg en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.10 Acumulación de macronutrientos en raíz.

La acumulación de macronutrientos en raíces de lechuga, mostraron diferencias estadísticas significativas. Para N, en la primera fecha de muestreo (9 días de tratamiento), las raíces de plantas tratadas con nanofertilizante-urea al 50% presentaron el mayor valor de acumulación (20.5 mg) y fue diferente estadísticamente a los tratamientos testigos (AD, NPA y NPAE) y a un tratamiento que contenía fuente de N (NU25%E). En la segunda fecha de muestreo (13 días de tratamiento) la raíces con mayor acumulación de N se evidenciaron con los tratamientos nanofertilizante-urea al 50% con y sin enzima y dichos tratamientos fueron estadísticamente diferentes al resto (Figura 3.15A).

En todos los contrastes, entre los grupos de los tratamientos testigos, urea convencional y nano-urea, realizados se muestran diferencias estadísticas significativas en la acumulación de N de raíces de lechuga (Cuadro 3.13).

Cuadro 3.14 Probabilidad de error (significancia) según contraste para acumulación de N en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con enzima alginatoliasa.

No.	Tratamientos contrastados	Pr>F	
1	(AD, NPA, NPAE) vs (U25%, U50%)	0.0077	*
2	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
3	(AD, NPA, NPAE) vs (NU25%, NU25%E)	<.0001	*
4	(AD, NPA, NPAE) vs (NU50%, NU50%E)	<.0001	*
5	(AD) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	0.0002	*
6	(NPA, NPAE) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*
7	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%)	<.0001	*
8	(U25%, U50%) vs (NU25%E, NU50%E)	0.0003	*
9	(U25%, U50%) vs (NU25%, NU50%, NU25%E, NU50%E)	<.0001	*

Tratamientos: AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

La base molecular del transporte de la urea está empezando a ser comprendida en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). La identificación del transportador de urea de alta afinidad *AtDUR3* por Liu *et al.* (2003a) y de las permeasas de urea (para la proteína intrínseca del tonoplasto) (Liu *et al.*, 2003b) condujeron a nuevos conocimientos sobre las bases moleculares de la absorción de urea en plantas. La regulación de la expresión de *AtDUR3* es específica del tejido y está ligada a la fuente de N en *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2003a). Este gen se expresa en niveles bajos en los brotes y se regula durante la germinación temprana y con deficiencia de N en las raíces. Liu *et al.* (2003a) propusieron que *AtDUR3* desempeña un papel en la absorción de urea por las células vegetales a bajas concentraciones de urea externa. Esta hipótesis se confirmó, ya que dos líneas de ADNt con inserciones en el gen *AtDUR3* mostraron un incremento, cuando la urea es usada como única fuente de N. Localizado en la membrana plasmática, la proteína *AtDUR3* ha demostrado ser el principal transportador para la absorción de urea de alta afinidad en las raíces de *Arabidopsis* (Kojima *et al.*, 2006).

La regulación de la absorción de urea descrita por Witte (2011), se confirma con lo obtenido por Mérigou *et al.* (2008), quienes estudiaron la exposición de *Arabidopsis* a soluciones con diferentes fuentes de N entre ellas urea, después de siete días de tratamiento, las raíces de las plantas expuestas a urea, contenían altos niveles de Glutamina y Alanina. Esto sugiere que, en el tejido de la raíz, la urea es degradada primero en el citosol por la ureasa y luego el amonio es incorporado a través del ciclo GS(NADH)-GOGAT. Mérigou *et al.* (2008) mencionan también que cerca del 80% de la urea es asimilada en la raíz, y el resto es movilizado a la parte aérea de la planta. Como

se indicó previamente y de acuerdo a los resultados se destaca una mayor concentración y acumulación de N en raíz en las plantas tratadas con alguna fuente de N.

Con los resultados de esta investigación se observa una mayor concentración y acumulación de N en las plantas tratadas con nano-urea con y sin la adición de enzima, esto pudiera ser debido a que la planta introduce las partículas de nano-urea mediante los mecanismos descritos por Du *et al.* (2017), así como la urea liberada por la enzima alginatoliasa en la solución.

Se muestra en la **Figura 3.7** y **3.12** que las partículas de nano-urea absorbidas en raíz son transportadas a la parte aérea de las plantas de lechuga, después de que la nano-urea es degradada, la concentración de urea aumenta en el citosol, causando toxicidad y necrosis en hojas (**Figura 3.2**), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Krogmeier *et al.* (1989), quienes al aplicar urea observaron quemaduras en hojas de soya a concentraciones de 4% de urea en materia seca, concluyendo que la toxicidad no es debido a la formación de cantidades tóxicas de amoníaco por la hidrólisis de urea, sino la acumulación de cantidades tóxicas de urea en hoja.

En P, a los 9 días de tratamiento, los valores medios superiores se mostraron con los tratamientos nanopartículas de alginato sin carga de urea y urea 50% (3.8 y 3.7 mg, respectivamente) y estadísticamente diferente únicamente con el tratamiento de agua destilada. A los 13 días de los tratamientos urea 25%, nanofertilizante-urea al 50% nanofertilizante-urea al 25% con enzima y nanofertilizante-urea al 50% con enzima fueron mayores y estadísticamente diferente únicamente al tratamiento de nanopartículas de alginato sin carga de urea (**Figura 3.15B**).

En el caso de K, a los 9 días de tratamiento, la mayor acumulación se determinó en las raíces de plantas tratadas con nanopartículas de alginato sin carga de urea y fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. De manera similar, a los 13 días, el tratamiento nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima fue superior al resto de los tratamientos (**Figura 3.15C**).

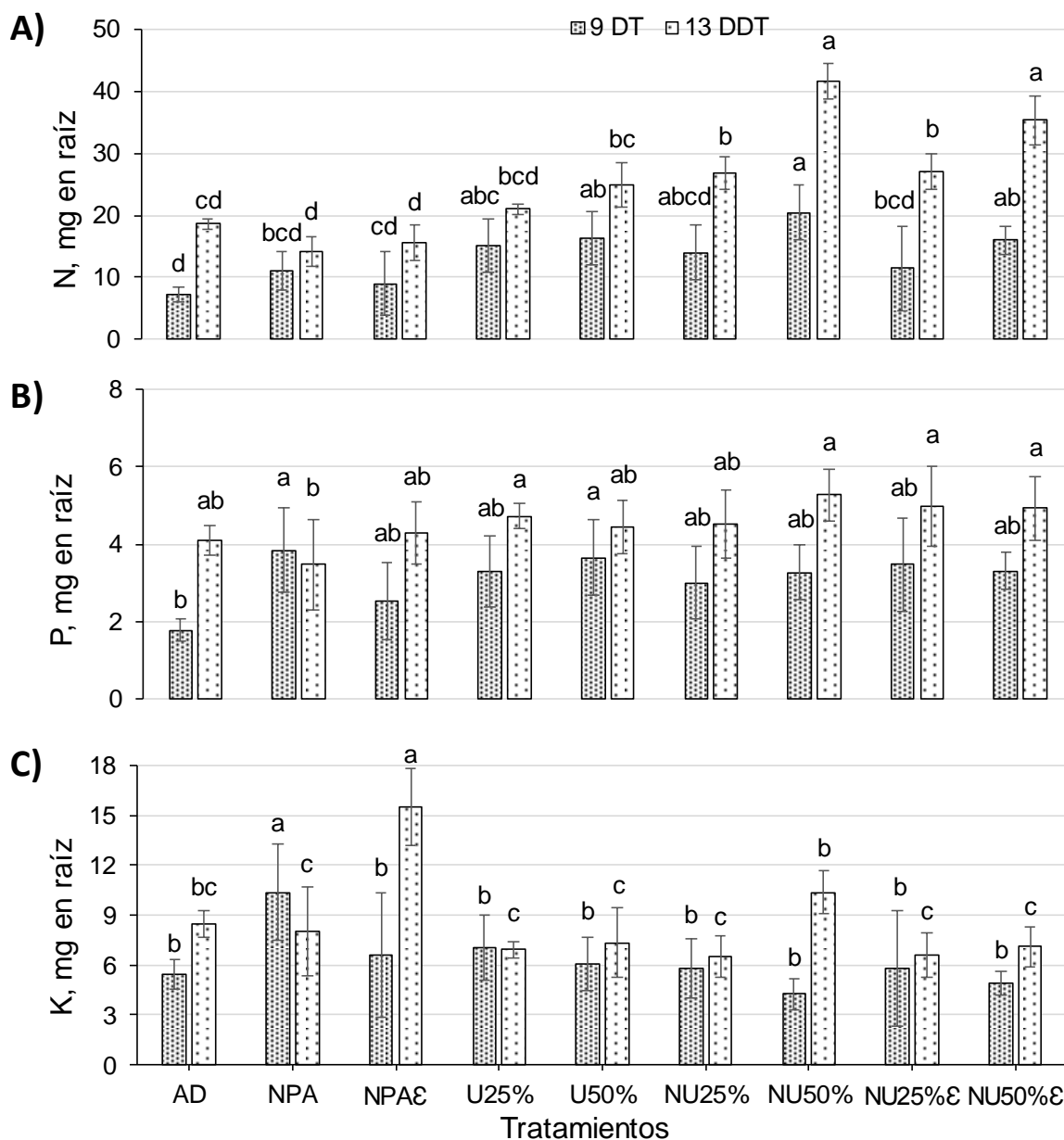


Figura 3.15 Acumulación de macronutrientes de N, P y K en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** **AD.** agua destilada; **NPA.** nanopartículas de alginato sin carga de urea. **NPA ϵ .** nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. **U25%.** urea 25%; **U50%** urea 50%; **NU25%.** nanofertilizante-urea al 25%; **NU50%.** nanofertilizante-urea al 50%; **NU25% ϵ .** nanofertilizante-urea al 25% con enzima; **NU50% ϵ .** nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

A los 9 días de tratamiento, en acumulación de Ca, las raíces de plantas tratadas con nanopartículas de alginato sin carga de urea y urea 50% fueron superiores y estadísticamente diferentes solo al tratamiento de agua destilada. Mientras que, la acumulación de Mg no se vio afectada por los tratamientos, es decir, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (**Figura 3.16A y B**).

Finalmente, a los 13 días de tratamiento, en Ca el tratamiento con nanofertilizante-urea al 50% fue superior y estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (**Figura 3.16A**); mientras que para Mg los tratamientos de nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima, nanofertilizante-urea al 50% y nanofertilizante-urea al 50% con enzima fueron superiores y estadísticamente diferentes sólo a un tratamiento (NPA) (**Figura 3.16B**).

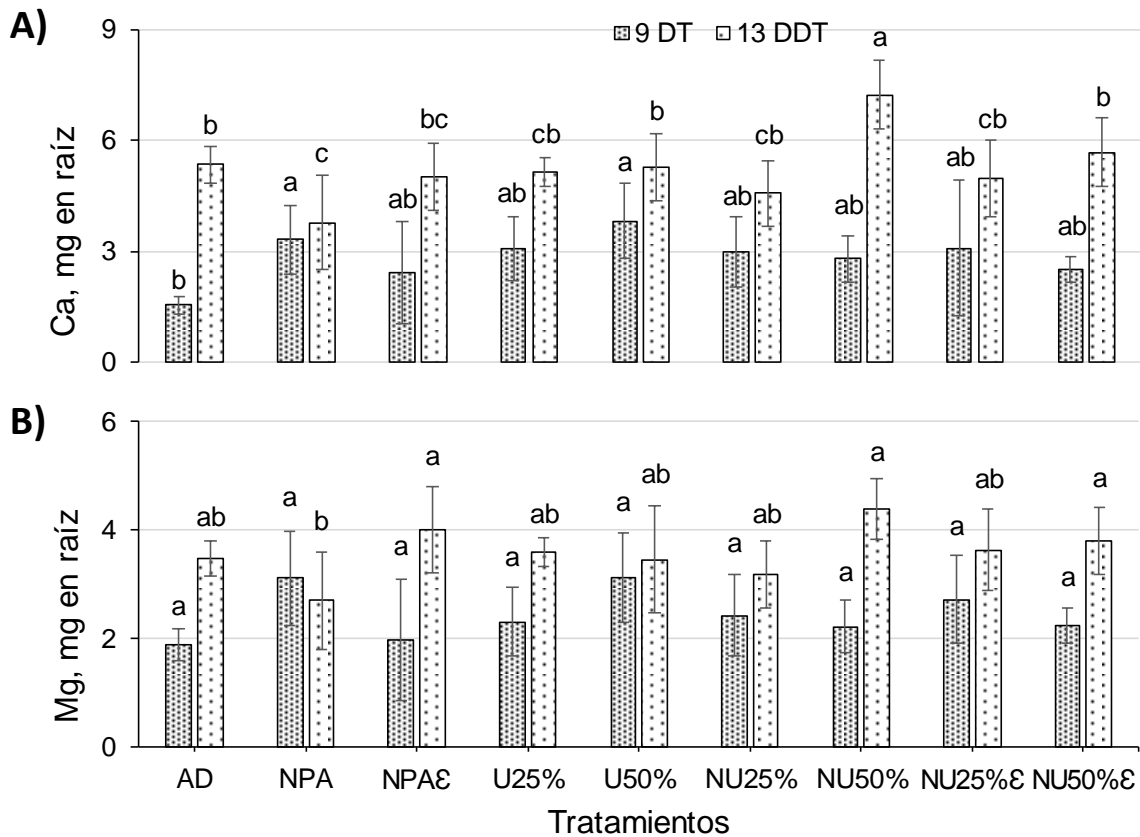


Figura 3.16 Acumulación de macronutrientes de Ca y Mg en raíz de plantas de lechuga cv. Starfighter a los 9 y 13 días de tratamiento con diferentes concentraciones de N a partir de urea, nanourea y nanourea con adición de enzima alginatoliasa. Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha indican diferencia estadística significativa (LSD $P \leq 0.05$; $n=9$) entre tratamientos. **Tratamientos:** AD. agua destilada; NPA. nanopartículas de alginato sin carga de urea. NPAE; nanopartículas de alginato sin carga de urea con enzima. U25%. urea 25%; U50% urea 50%; NU25%. nanofertilizante-urea al 25%; NU50%. nanofertilizante-urea al 50%; NU25%E. nanofertilizante-urea al 25% con enzima; NU50%E. nanofertilizante-urea al 50% con enzima.

3.3.11 Correlación Lectura SPAD y concentración de N en vástago

Existe una relación directa entre la lectura SPAD y el contenido nutrimental de N (Escalona *et al.*, 2009), debido a que la clorofila, pigmento que da el color verde de las hojas y que se encarga de absorber la luz necesaria para realizar actividad fotosintética. Se correlacionó positivamente con el contenido de N en la planta (Sánchez *et al.*, 2015); la intensidad de verdor en las hojas refleja una planta fertilizada adecuadamente de N (Escalona *et al.*, 2009).

La correlación de lectura SPAD y concentración de N (g kg^{-1}), en hojas de las plantas de lechuga evaluadas, fue positiva y se ajustó a un modelo lineal con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.70, que indica, que a medida que se incrementa la concentración de N en plantas de lechuga, los valores de SPAD aumentan (Figura 3.17).

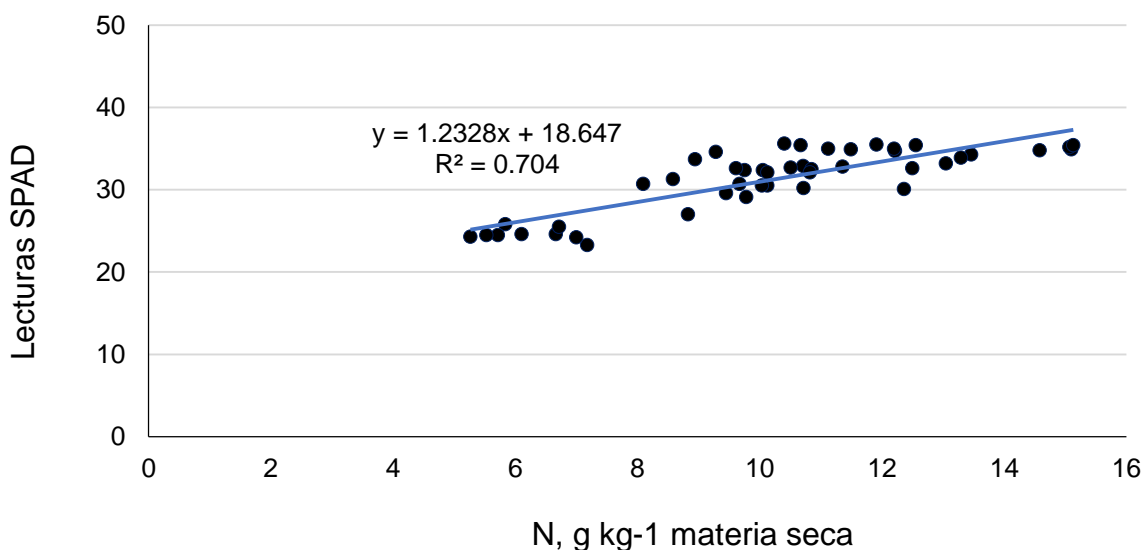


Figura 3.17 Correlación de lectura SPAD en hojas de lechugas y concentración de N en vástago de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Starfighter a los 13 días de tratamiento.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se demuestra la absorción de urea en las plantas de lechuga cv. Starfighter bajo las diferentes fuentes evaluadas. Los efectos de los tratamientos con urea convencional en las plantas de lechuga tuvieron los valores más altos en volumen de raíz, número de hojas y biomasa fresca de raíz

Las plantas tratadas con nano-urea con adición de enzima presentaron los valores mayores en área foliar biomasa seca en hoja y raíz, concentración de N en vástago y concentración y acumulación de N en raíz.

La fuente de N con nano-urea 25% mostró mayores valores en biomasa fresca de hoja y fenoles totales.

Finalmente, con nano-urea 50% se obtuvo una mayor acumulación de N en vástago SPAD.

LITERATURA CITADA

- Azeem, B., KuShaari, K., Man, Z. B., Basit, A., Thanh, T. H. (2014). Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. *Journal of Controlled Release*, 181, 11-21.
- Barel, D. C.A. Black. 1979. Effect of neutralization and addition of urea, sucrose, and various glycols on phosphorus absorption and leaf damage from foliar-applied phosphate. *Plant Soil* 52:515–525.
- Borgognone, D., Colla, G., Roupael, Y., Cardarelli, M., Rea, E., Schwarz, D. (2013). Effect of nitrogen form and nutrient solution pH on growth and mineral composition of self-grafted and grafted tomatoes. *Scientia horticultrae*, 149, 61-69.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. In: Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9. ed. Black, C. A. pp. 1149-1178. Madison, WI, USA.
- Deng, F., Wang, L., Ren, W. J., Mei, X. F., Li, S. X. (2015). Optimized nitrogen managements and polyaspartic acid urea improved dry matter production and yield of indica hybrid rice. *Soil and Tillage Research*, 145, 1-9.
- Du, W., Tan, W., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Ji, R., Yin, Y., Guo, H. (2017). Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: physiological and biochemical aspects. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 210-225.
- Escalona, A., Santana, M., Acevedo, I., Rodríguez, V., Merú Marcó, L. (2009). Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre el contenido de nitratos y lecturas" spad" en el cultivo de lechuga. *Agronomía Tropical*, 59(1), 99-105.
- FAO (2015). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Forde, B. G. (2014). Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Current opinion in plant biology*, 21, 30-36.

- Kanjana, D. (2015). Potential applications of nanotechnology in major agriculture divisions-A Review. **International Journal of Agriculture**, Environment and Biotechnology, 8(3), 699.
- Kojima, S., Bohner, A., Gassert, B., Yuan, L., Wirén, N. V. (2007). AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *The Plant Journal*, 52(1), 30-40.
- Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, N., Karunaratne, V. (2011). A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood. *Current science*, 73-78.
- Krogmeier, M. J., McCarty, G. W., Bremner, J. M. (1989). Phytotoxicity of foliar-applied urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(21), 8189-8191.
- Liu, L. H., Ludewig, U., Frommer, W. B., & von Wirén, N. (2003a). AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(3), 790-800.
- Liu, L. H., Ludewig, U., Gassert, B., Frommer, W. B., von Wirén, N. (2003b). Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(3), 1220-1228.
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L., Kendall, P. (2007). Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 552-557.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 280-287.
- MacAdam, J. W., Volenec, J. J., & Nelson, C. J. (1989). Effects of nitrogen on mesophyll cell division and epidermal cell elongation in tall fescue leaf blades. *Plant Physiology*, 89(2), 549-556.

- Marschner, H. (2011). Functions of Macronutrients. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press. pp.135-190. Australia. School of Agriculture, Food and Wine. The University of Adelaide
- Mérigout, P., Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J. P., Briand, X., Meyer, C., Daniel-Vedele, F. (2008). Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 147(3), 1225-1238.
- Mirassón, H. R., Faraldo, M. L., Fioretti, M. N., Miravalles, M., Bredan, R. E. (2010). Relaciones entre el índice de verdor y el nivel hídrico foliar en trigo con diferentes sistemas de labranza. *Revista internacional de botánica experimental*, 79(2), 183-187.
- Mukhopadhyay, S. S. (2014). Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnology, science and applications*, 7, 63.
- Na, L., Li, Z., Xiangxiang, M., Ara, N., Jinghua, Y., Mingfang, Z. (2014). Effect of nitrate/ammonium ratios on growth, root morphology and nutrient elements uptake of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. *Journal of plant nutrition*, 37(11), 1859-1872.
- Nicoulaud, B. A., Bloom, A. J. (1996). Absorption and assimilation of foliarly applied urea in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121 (6), 1117-1121.
- Peltonen, J. (1993). Interaction of late season foliar spray of urea and fungicide mixture in wheat production. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 170(5), 296-308.
- Pérez-de-Luque, A. (2017). Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture?. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 12.
- Quiroz-Reyes, C. N., Aguilar-Méndez, M. A., Ramírez-Ortíz, M. E., Ronquillo-De Jesús, E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1).

- Roggatz, U., McDonald, A. J. S., Stadenberg, I., Schurr, U. (1999). Effects of nitrogen deprivation on cell division and expansion in leaves of *Ricinus communis* L. *Plant, Cell & Environment*, 22(1), 81-89.
- Sánchez, A., Delgado, R., Lorbes, J., Rodríguez, V., Figueredo, L., Gómez, C. (2015). Diagnóstico e índice para fertilización nitrogenada en etapa vegetativa del cultivo maíz (*Zea mays* L.). *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 33, 75-82.
- SIAP. (2015) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/default.aspx>
- Secretaría de economía (2017). Sistema de información arancelaria vía internet (SIAVI). <http://www.economia-snci.gob.mx/>.
- Steiner, A. A., & van Winderen, H. (1970). Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant physiology*, 46(6), 862.
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. In 6. *International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands)*, 29 Apr-5 May 1984. ISOSC.
- Subramanian, K. S., Thirunavukkarasu, M. (2017). Nano-fertilizers and Nutrient Transformations in Soil. In *Nanoscience and Plant–Soil Systems*. Cham: Springer. pp. 305-319.
- Troelstra, S. R., Wagenaar, R., Smant, W. (1995). Nitrogen utilization by plant species from acid heathland soils: I. Comparison between nitrate and ammonium nutrition at constant low pH. *Journal of Experimental Botany*, 46(9), 1103-1112.
- Vos, J., Van der Putten, P. E. L. (1998). Effect of nitrogen supply on leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in potato. *Field Crops Research*, 59(1), 63-72.
- Vos, J., Van der Putten, P. E. L., Birch, C. J. (2005). Effect of nitrogen supply on leaf appearance, leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in maize (*Zea mays* L.). *Field Crops Research*, 93(1), 64-73.
- Witte, Claus-Peter. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180 (3), 431-438.