



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE
EFICIENCIA DE NANOFERTILIZANTES
FUENTE DE FÓSFORO**

ERIKA MIRANDA VILLAGÓMEZ

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

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: **Síntesis y evaluación de eficiencia de nanofertilizantes fuente de fósforo**, realizada por la alumna Erika Miranda Villagómez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)



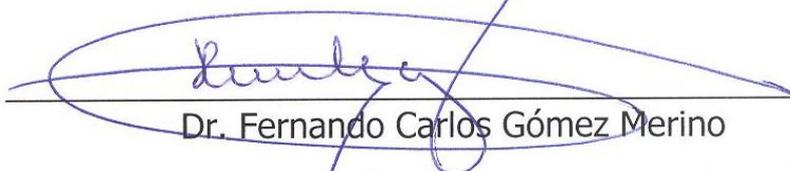
Dra. Libia Iris Trejo-Téllez

DIRECTOR
DE TESIS



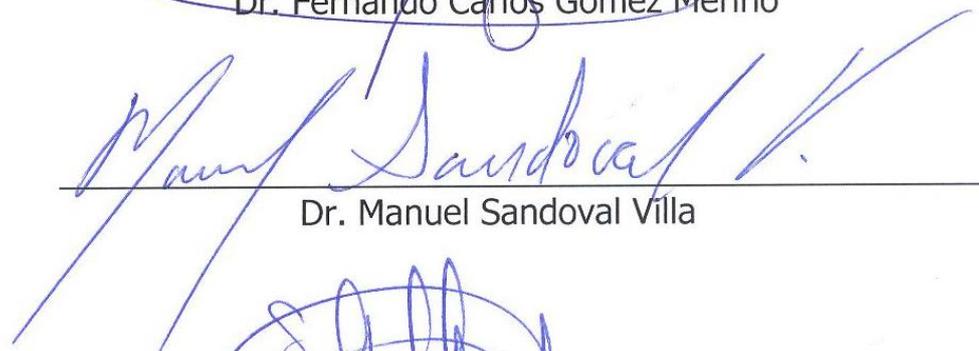
Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez

ASESOR



Dr. Fernando Carlos Gómez Merino

ASESOR



Dr. Manuel Sandoval Villa

ASESORA



Dra. Soledad García Morales

ASESOR



Dr. Prometeo Sánchez García

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Agosto de 2017

Síntesis y evaluación de eficiencia de nanofertilizantes fuente de fósforo

Erika Miranda Villagómez, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

En esta investigación se realizó la síntesis de nanopartículas cargadas con P y K a partir de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) con polímeros naturales (gelatina tipo B, gelatina tipo A y alginato de sodio), en un equipo Nano Spray Dryer B-90. Tanto con la gelatina tipo B como con el tipo A se obtuvieron partículas cuasi esféricas con tamaño promedio de 682 y 865 nm, respectivamente; con el alginato de sodio, las nanopartículas resultantes tuvieron mejor forma (esférica) y menor tamaño (600 nm). Entre el KH_2PO_4 y el alginato se muestra una interacción en los puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílicos del carbohidrato y los grupos OH^- del anión H_2PO_4^- , mientras que la gelatina se encuentra interaccionando con los grupos OH^- y con el anión H_2PO_4^- . Se determinó el tiempo de liberación de P y K en agua destilada. La liberación de P y K en las nanopartículas con gelatina tipo A fue creciente y constante después de 24 y 72 h, respectivamente. La adición de tripsina en las soluciones en agua destilada de las nanopartículas recubiertas con gelatina tipo A aumentó tres veces la concentración de P en solución, mientras que la de K fue 2.6 veces más alta. La adición de α -amilasa a soluciones en agua de nanopartículas de alginato de sodio, aumentó las concentraciones de P y de K en solución cerca de 1.3 y 1.1 veces, respectivamente. Las nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 que mostraron un menor tamaño y mejor formación esférica fueron las cubiertas con alginato de sodio; mientras que las cubiertas con gelatina A mostraron mayor uniformidad en cuanto a forma y tamaño. En un segundo ensayo se evaluó la eficiencia de las nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 y cubiertas con gelatina tipo A como fuente de P, en el crecimiento, absorción y acumulación de macronutrientes y parámetros relacionados con fotosíntesis en plantas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) cv. Morelos A-2010, bajo condiciones de invernadero. Se trataron las plantas durante 14 días con concentraciones de P del 50 y 100% de las establecidas en la solución Yoshida, a partir de KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con adición de tripsina; adicionalmente se tuvieron dos testigos (agua destilada y el polímero gelatina tipo A). Las soluciones fueron renovadas cada 7 d. Se observó que las plantas de arroz tuvieron una absorción diferencial de P en función de la fuente de éste. El P suministrado a partir de KH_2PO_4 tuvo una tasa de absorción más alta que el P ofertado a partir de nano- KH_2PO_4 , solo o con tripsina. Sin embargo, la oferta de P como nano- KH_2PO_4 promovió una mayor eficiencia fisiológica del vástago y la raíz para P, lo que se tradujo en su mayor acumulación en estos órganos. La concentración de P en vástago de P, así como su acumulación en vástago y raíces se relacionó positivamente con la tasa fotosintética. Asimismo, el tratamiento con nano- KH_2PO_4 incrementó la eficiencia instantánea del uso del agua en las plantas de arroz.

Palabras clave: Nanopartículas, biopolímeros, tiempo de liberación, eficiencia fisiológica, eficiencia de absorción de P, concentración y acumulación nutricional.

Synthesis and evaluation of the efficiency of nanofertilizers source of phosphorus

Erika Miranda Villagómez, D. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

In this research the synthesis of nanoparticles loaded with P and K from monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) with natural polymers (gelatin type B, gelatin type A and sodium alginate) was carried out with the help of a Nano Spray Dryer B-90. With gelatin type B and type A, quasi spherical particles with an average size of 682 and 865 nm respectively were obtained; With sodium alginate, the resulting nanoparticles had better shape (spherical) and smaller size (600 nm). Between the KH_2PO_4 and the alginate an interaction is shown in the hydrogen bonds among the carboxylic groups of the carbohydrate and the OH-groups of the anion H_2PO_4^- , while the gelatin is interacting with the OH- groups and with the anion H_2PO_4^- . The time of release of P and K in distilled water was determined. The release of P and K in the nanoparticles with gelatin type A was increasing and constant after 24 and 72 h, respectively. The addition of trypsin in the solutions in distilled water of the nanoparticles coated with gelatin type A, increased three times the concentration of P in solution, while that of K rose 2.6 times. The addition of α -amylase to water solutions of sodium alginate nanoparticles increased the P and K concentrations in solution by about 1.3 and 1.1 times, respectively. The nanoparticles loaded with KH_2PO_4 that showed a smaller size and better spherical formation were those coated with sodium alginate; while those coated with gelatin type A showed greater uniformity in shape and size. A second assay evaluated the efficiency of KH_2PO_4 -loaded nanoparticles coated with gelatin type A as a source of P on the growth, uptake and accumulation of macronutrients and parameters related to photosynthesis in rice plants (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) cv. Morelos A-2010, under greenhouse conditions. Plants were treated for 14 days at concentrations of 50 and 100% of those established in the Yoshida nutrient solution, from KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 and nano- KH_2PO_4 with addition of trypsin. Additionally two controls (distilled water and gelatin type A polymer) were included. The nutrient solutions were renewed every 7 d. It was observed that rice plants exhibited a differential absorption of P depending on the source of this one. The P supplied from KH_2PO_4 has a higher absorption rate than the P provided from nano- KH_2PO_4 , alone or with trypsin. However, the supply of P as nano- KH_2PO_4 promoted greater physiological efficiency of the stem and root for P, which translates into its greater accumulation in these organs. The concentration of P in stem of P, as well as its accumulation in stem and roots was positively related to the photosynthetic rate. Also, the treatment with nano- KH_2PO_4 increased the instantaneous efficiency water use in the rice plants.

Keywords: Nanoparticles, biopolymers, release time, physiological efficiency, P absorption efficiency, nutrient concentration and accumulation.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por tu amor y tu bondad, mi eterno agradecimiento por darme la oportunidad, sabiduría y fuerza para culminar mis estudios. Por permitirme vivir tan bellos momentos.

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

A la **Dra. Libia Iris Trejo-Téllez**, mi profundo agradeciendo por el apoyo y por creer en este proyecto de tesis. El camino no ha sido fácil, pero la experiencia que gané y sus aportaciones son invaluable. Gracias por todo este tiempo trabajando juntas.

Al **Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez** y la **Dra. Elba Ronquillo de Jesús** por el tiempo dedicado y su conocimiento aportado para cumplir esta meta, hago extenso mi más sincero agradecimiento.

A los **Dres. Fernando Carlos Gómez Merino, Manuel Sandoval Villa, Prometeo Sánchez García y Soledad García Morales**. Sus aportaciones fueron sumamente valiosas durante la realización de esta investigación.

A mis padres **Adela Villagómez R.** y **Ramón Miranda L.**, por nunca dejarme sola, por guiarme y por apoyar cada una de mis decisiones y proyectos. Estoy eternamente agradecida con ustedes.

DEDICATORIA

A mis padres **Adela Villagómez R.** y **Ramón Miranda L.** por darme la vida y por confiar en mí. Los amo.

A mi hija **Vania** por la paciencia, comprensión y por el sacrificio de dejar de hacer cosas juntas por falta de tiempo. Me inspiraste a ser mejor para ti, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti, y espero ser ejemplo en tu vida. Te amo.

A mis hermanos **Saúl, Elvia, Francisco y Fabiola**, compartir la vida con ustedes es el regalo más hermoso que dios me ha dado. Los amo.

A mi cuñado el Dr. Luis López P. y a mis cuñadas Maura y Mayra

A mis sobrinos Ale, Jorge, Mariana, Paola, Rodrigo, Leonardo, Benjamín y Paquito.

A mis primos-hermanos Héctor, Iliana, Marisol, Vanesa y Yesenia.

A mis tíos, Gregorio, Trinidad y Carolina.

En especial a **Miguel Angel** y **Erwin** por aventurarse y compartir conmigo esta grata experiencia, por sus aportaciones, tiempo, desvelos y esfuerzo. No tengo como pagarles lo que han hecho por mí.

A Luci y Leti.

A Margarita Hernández H. y Efrén Cruz C., por su apoyo incondicional.

Gracias a Dios por todas las bendiciones y abundancia en mi vida

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Panorama general de los fertilizantes: fósforo y potasio.....	1
Problemática del uso de fósforo en la agricultura.....	3
Nanotecnología.....	4
Aspectos reglamentarios en el uso de la nanotecnología.....	4
Implicaciones ecológicas por el uso de nanomateriales.....	7
Uso de la nanotecnología en la agricultura: Nanofertilizantes.....	8
Absorción y movimiento de nanopartículas en las plantas.....	10
LITERATURA CITADA	12
CAPÍTULO I. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS CARGADAS CON FÓSFORO Y POTASIO: CARACTERIZACIÓN Y PRUEBAS DE LIBERACIÓN	17
1.1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
1.3 RESULTADOS.....	24

	Página
1.3.1. Tamaño y morfología de nanopartículas.....	24
1.3.2. Evaluación de las interacciones entre el KH_2PO_4 y los biopolímeros.....	26
1.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	29
1.3.4. Concentración de P y K.....	32
1.3.5. Liberación de P y K con adición de enzimas.....	36
1.4. DISCUSIÓN.....	38
1.5. CONCLUSIONES.....	42
1.5. LITERATURA CITADA.....	42

CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE UN NANOFERTILIZANTE

FOSFATADO EN EL CRECIMIENTO, ESTADO NUTRIMENTAL Y

FOTOSÍNTESIS DE PLANTAS DE ARROZ.....	46
2.1. INTRODUCCIÓN.....	46
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
2.2.1. Ubicación del experimento y material vegetal.....	48
2.2.2. Establecimiento del experimento.....	49
2.2.3. Tratamientos evaluados.....	49
2.2.4. Variables evaluadas.	51
2.2.5. Análisis estadístico.....	52
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
2.3.1. Disminución de P en las soluciones nutritivas.....	53
2.3.2. Altura de planta.....	54
2.3.3. Número de hojas.....	56
2.3.4. Número de macollos	59
2.3.5. Biomasa seca.....	61
2.3.6. Concentración de macronutrientos en vástagos.....	64

	Página
2.3.7. Acumulación de macronutrientos en vástagos.....	68
2.3.8. Concentración de macronutrientos en raíz.....	71
2.3.9. Acumulación de macronutrientos en raíz	74
2.3.10. Variables relacionadas con fotosíntesis.....	78
2.4. CONCLUSIONES.....	84
2.5. LITERATURA CITADA.....	84

LISTA DE CUADROS

Página

CAPÍTULO 1

Cuadro 1.1.	Temperatura de fusión (T_{peak}), transición (T_g) y entalpía (ΔH) de nanopartículas de gelatina tipo A y alginato con carga y sin carga de KH_2PO_4	31
--------------------	--	----

CAPÍTULO 2

Cuadro 2.1.	Tratamientos evaluados en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010.	50
Cuadro 2.2.	Biomasa seca total y relación de biomasa seca vástago/raíz de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	64

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Figura 1.1.	Micrografía de nanopartículas con gelatina tipo B (A) e histograma de distribución de tamaño de partícula (B)...	24
Figura 1.2.	Micrografía de nanopartículas con gelatina tipo A (A) e histograma de distribución de tamaño de partícula (B).....	25
Figura 1.3.	Micrografía de nanopartículas con alginato de sodio (A) e histograma de distribución de tamaño de partícula (B).....	26
Figura 1.4.	Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de alginato, KH_2PO_4 , nanopartículas de alginato (NPAIg) y nanopartículas de alginato cargadas con KH_2PO_4 (NPAIg KH_2PO_4).	27
Figura 1.5.	Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de gelatina tipo A (Gelatina A), KH_2PO_4 , nanopartículas de gelatina tipo A (NPGA) y nanopartículas de gelatina tipo A cargadas con KH_2PO_4 (NPGA- KH_2PO_4).	29
Figura 1.6.	Termograma del fertilizante (KH_2PO_4), nanopartículas de gelatina tipo A (NPGA), gelatina tipo A cargadas con fertilizante (NPGA- KH_2PO_4), nanopartículas de alginato (NPAIg) y alginato cargadas con fertilizante (NPAIg- KH_2PO_4).	30

Figura 1.7.	Concentración de P (A) y K (B) en KH_2PO_4 , en pruebas de liberación, usando KH_2PO_4 , nanopartículas con gelatina tipo A cargadas con KH_2PO_4 y polímero gelatina tipo A, disueltos en agua destilada después de diferentes tiempos de agitación.....	33
Figura 1.8.	Concentración de P (A) y K (B) en KH_2PO_4 , en pruebas de liberación, usando KH_2PO_4 en nanopartículas recubiertas con alginato de sodio cargadas con KH_2PO_4 y en el polímero alginato de sodio, disueltos en agua destilada después de diferentes tiempos de agitación.....	35
Figura 1.9.	Liberación de P y K de nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 , y gelatina tipo A sin y con adición de la enzima tripsina.....	36
Figura 1.10.	Liberación de P y K de nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 y alginato de sodio sin y con adición de la enzima α -amilasa.....	37

CAPÍTULO 2

Figura 2.1.	Concentración de P en la solución inicial (día 8 del inicio de tratamientos) y su disminución después de 7 d en presencia de plantas de arroz (día 14 del inicio de tratamientos)	53
--------------------	--	----

Figura 2.2.	Altura de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	55
Figura 2.3.	Número de hojas en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	57
Figura 2.4.	Número de macollos en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	60
Figura 2.5.	Peso de biomasa seca de vástago y de raíz de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	62
Figura 2.6.	Concentración de macronutrientes en vástagos de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	67
Figura 2.7.	Acumulación de macronutrientes en vástagos de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	69
Figura 2.8.	Concentración de macronutrientes en raíces de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	73
Figura 2.9.	Acumulación de macronutrientes en raíces de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	75

Figura 2.10.	Tasa fotosintética de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	79
Figura 2.11.	Conductancia estomática, concentración intercelular de CO ₂ (C _i) y transpiración en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.....	82

INTRODUCCIÓN GENERAL

Panorama general de los fertilizantes: fósforo y potasio

Los fertilizantes son compuestos químicos empleados para promover el crecimiento de plantas y frutas, y por lo general se aplican al suelo (absorción por las raíces de las plantas), o vía foliar (absorción a través de las hojas) (Corradini *et al.*, 2010). Éstos se clasifican en orgánicos e inorgánicos. Los orgánicos son derivados de productos vegetales o animales y los inorgánicos son aquellos obtenidos de procesos químicos desarrollados a escala industrial (Domínguez, 1997).

La aplicación de fertilizantes en la agricultura busca la eficiencia agronómica, el manejo sustentable de los insumos y del propio sistema de producción. En los enfoques de la agricultura sustentable, el componente ambiental debe considerar el impacto de los fertilizantes en el sistema de producción cuando no son absorbidos por la planta (Roberts, 2008). Los fertilizantes sintéticos en particular, tienen un gran potencial para contaminar el suelo, agua y aire; por lo que en los últimos años, se han hecho muchos esfuerzos para minimizar estos problemas con las prácticas agrícolas y el diseño de los nuevos fertilizantes mejorados (Siddiqui y Al-Whaibi, 2014).

De acuerdo con la FAO (2015), el consumo mundial de fertilizante (N+P₂O₅+K₂O) se estimó en 190.7 millones de toneladas en 2015. Si se considera un crecimiento anual sucesivo en la demanda de 1.8 %, se prevé que para 2018, el consumo de fertilizantes alcance las 194.2 millones de toneladas.

El fósforo (P) es un macronutriente para las plantas superiores y representa alrededor de 0.2 % de materia seca. Es un componente de moléculas clave tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP, por lo que las plantas con baja disponibilidad de este elemento limitan su crecimiento. Las plantas absorben el P preferentemente en forma de fosfato inorgánico (Pi) (Wu *et al.*, 2013). El Pi también está involucrado en el control de reacciones enzimáticas y en la regulación de las vías metabólicas. La absorción de P se realiza mediante proteínas transportadoras localizadas en las raíces de la planta. Es un elemento altamente móvil *in planta*, por tanto, también en su transporte, compartimentalización y redistribución se encuentran involucradas diversas proteínas de membrana (Schachtman *et al.*, 1998).

Por otra parte, el potasio (K⁺) es uno de los macronutrientes de mayor importancia en el crecimiento y desarrollo de la planta; es el catión más abundante dentro de la misma (Hafsi *et al.*, 2014), juega un papel importante en la célula vegetal principalmente en procesos funcionales tales como activación enzimática, transporte, osmo-regulación, síntesis de almidones y proteínas, movimiento estomático y balance de cargas iónicas. Las células de la raíz de las plantas absorben al K desde el suelo contra un gradiente de concentración, proceso que es realizado por los componentes del sistema de transporte de K⁺ de plantas tales como transportadores y canales (Wang y Wu, 2013). Posterior a su absorción, el K⁺ es acumulado en las células de la planta y constituye entre el 2 y 10 % del peso de materia seca, dependiendo de la especie, fase de desarrollo, entre otros factores. El incremento en la concentración de K en tejido foliar aumenta la actividad fotosintética, la translocación de fotoasimilados y de

compuestos amino desde órganos fuente hasta órganos reproductivos a través del floema. Por otra parte, la deficiencia de K^+ conduce a una disminución en la fotosíntesis debido a la acumulación de sacarosa en las hojas (Alemán *et al.*, 2011). En la producción agrícola, se utiliza K^+ para aumentar los rendimientos de los cultivos y la calidad, sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes conduce a su lixiviación en el suelo (en mayor cantidad en suelos arenosos), lo cual contribuye a la contaminación del medio ambiente (Shin, 2014).

Problemática del uso de fósforo en la agricultura

La producción de alimentos requiere la aplicación de fertilizantes entre ellos los fosforados, con el fin de mejorar los rendimientos. Sin embargo, la agricultura moderna depende de fósforo derivado de roca fosfórica, que es un recurso no renovable y las reservas mundiales actuales se estima que pueden agotarse en un periodo de entre 50 y 100 años. Adicionalmente, los costos de producción de fertilizantes fosforados están en aumento (Cordell *et al.*, 2009).

La descarga de aguas residuales de actividades agrícolas e industriales contribuye al enriquecimiento de P en los ecosistemas acuáticos (Moharami y Jalali, 2014). El fósforo, se puede encontrar en el agua con formas de ortofosfatos, polifosfatos y fosfatos orgánicos. Se sabe que una concentración alta de fósforo (96 a 384 $mg\ m^{-3}$; Franco, 2010) en los cuerpos de agua causa eutrofización. La eutrofización da como resultado un abundante crecimiento de fitoplancton y por tanto esta biomasa producida por los organismos fotosintéticos puede descomponerse desoxigenando el agua, generando malos olores y causando la muerte masiva de peces (Eljama *et al.*, 2016).

Además del problema de la eutrofización, la producción de fertilizantes a partir de roca fosfórica implica importantes emisiones de carbono, subproductos radiactivos y contaminantes de metales pesados. El procesamiento y transporte de fertilizantes fosfatados desde la mina hasta los campos de cultivos, implican un costo energético cada vez mayor. Ante la creciente preocupación por la escasez de petróleo y el cambio climático, es necesario reconsiderar la producción y el uso actual del fósforo, en particular con respecto al uso de la energía y otros impactos ambientales ([Cordell et al., 2009](#)).

Nanotecnología

El término nanotecnología fue usado por primera vez en 1959 por el físico Richard Feynman, quien señaló la capacidad de manejar materiales a nivel nanométrico. El nano es un prefijo griego que significa enano y abarca una amplia gama de fenómenos y objetos cuyas dimensiones son de una millonésima parte de un milímetro (1×10^{-9} m) ([Foladori, 2013](#)). Esta tecnología que, aparte de estar caracterizada por operar a tales dimensiones (en la que también funcionan otras disciplinas como la química y la biología), alude en particular al diseño, caracterización y producción de nuevas nanoestructuras, nanodispositivos y nanosistemas basados en "controlar" la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a dicha escala ([Delgado-Ramos, 2014](#)).

Aspectos reglamentarios en el uso de la nanotecnología

En la actualidad no existen normas sobre la regulación de nanofertilizantes; los primeros intentos de reglamentación están de manera general sobre nanomateriales, que sería el primer paso para después particularizarse a los

nanofertilizantes. Estados Unidos de América y la Unión Europea son los pioneros en esta regulación ([Gogos *et al.*, 2012](#)).

El rápido desarrollo de nanomateriales manufacturados y su presencia en algunos mercados hacen que sea necesario evaluar sus impactos ambientales y en la salud. Dadas las preocupaciones acerca de la seguridad de algunos nanomateriales, y el problema de la inadecuada generalización debido a la amplia gama de aplicaciones nanotecnológicas, es necesario y urgente hacer frente a este vacío en la regulación ([European Commission Recommendation, 2011](#)).

Por otra parte, un programa de trabajo se ha puesto en marcha como parte del programa europeo FP7 marco nanociencias, nanotecnologías, materiales y nuevas tecnologías de producción (NMP), llamado NANoReg ([European Commission Recommendation, 2016](#)). Esta propuesta tiene el objetivo de establecer una colaboración entre las autoridades de los gobiernos europeos sobre los conocimientos necesarios para el adecuado manejo de riesgos. Asimismo, se pretende proporcionar a los legisladores un conjunto de herramientas para la evaluación del riesgo y la toma de decisiones para el corto y mediano plazo, mediante la recopilación de datos y la evaluación de riesgos piloto, incluyendo la exposición, seguimiento y control, para un número seleccionado de nanomateriales utilizados en los productos. Un segundo objetivo es que las autoridades consideren la protección de los trabajadores, la salud pública y el medio ambiente, así como crear la base de criterios comunes,

conjunto de datos mutuamente aceptable, y el manejo de riesgos ([European Commission Recommendation, 2016](#)).

La Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), está desarrollando un programa de ciencia reguladora en la nanotecnología para fomentar el desarrollo responsable de productos regulados por la FDA, que pueden contener nanomateriales. El programa establece las herramientas, los métodos y los datos para ayudar en la toma de decisiones regulatorias, mientras que también proporciona la experiencia interna y la capacidad científica que responda a los productos regulados por la FDA relacionados con la nanotecnología. La FDA define ciencia regulatoria como la ciencia del desarrollo de nuevos instrumentos, normas y enfoques para evaluar la seguridad, la eficacia, la calidad y rendimiento de los productos que regula ([FDA, 2013](#)).

La aplicación de la nanotecnología puede dar lugar a atributos del producto que difieren de los productos fabricados convencionalmente, y por tanto las evaluaciones de la seguridad o eficacia de los productos regulados por la FDA, que incluyen nanomateriales. Sin embargo, la FDA no juzga categóricamente todos los productos que contienen nanomateriales o de otra manera que involucren la aplicación de la nanotecnología como intrínsecamente benignos o dañinos. La FDA regulará los productos de la nanotecnología a cargo de autoridades legales existentes, de acuerdo con las normas legales específicas aplicables a cada tipo de producto bajo su jurisdicción ([FDA, 2016](#)).

En México, desde 2014 se presentó una propuesta de norma, la cual se concretó hasta el 2015 con la Norma Oficial Mexicana NMX-R-13830-SCFI-2014-Nanotecnologías-Guía para el etiquetado de nano-objetos manufacturados y de productos que contengan nano-objetos manufacturados. Esta norma mexicana proporciona orientación sobre el formato y contenido del etiquetado voluntario para nano-objetos manufacturados y productos, preparaciones y mezclas que contengan nano-objetos manufacturados ([NMX-R-13830-SCFI-2014, 2015](#)).

Implicaciones ecológicas por el uso de nanomateriales

Aunque gran parte de la investigación actual sobre los riesgos de nanomateriales se ha centrado en la salud humana, los modelos empleados en estos estudios ofrecen información acerca de los peligros para la biota del medio ambiente. Hay dos razones principales por las que las consideraciones ambientales son fundamentales en cuanto a la generación de nanomateriales. Una, es el hecho de que es una tecnología relativamente reciente que aún no ha causado daños. En segundo lugar, es la carencia de datos en cuanto a los posibles efectos que tengan los nanomateriales sobre los organismos y el ambiente, en caso de que fueran liberadas ([Keller *et al.*, 2013](#)).

Los estudios de toxicidad en curso producirán información útil para ayudar a dilucidar los riesgos ambientales de los nanomateriales. Sin embargo, la complejidad de los peligros ambientales se extiende más allá de la toxicología en los mamíferos. Las diferencias fisiológicas entre distintas clases de animales acuáticos y terrestres llevarán a consideraciones únicas ([Medina *et al.*, 2015](#)).

La exposición de nanomateriales al medio ambiente se puede producir a través del aire, agua o suelo. Aunque se sabe poco sobre el transporte aéreo de los nanomateriales, la investigación sustancial ha explorado la dispersión de partículas ultrafinas incidentales derivadas de fuentes tales como columnas de escape. Las partículas cuyos tamaños oscilan entre 1 y 100 nm se moverán por difusión, mientras que los movimientos de las partículas más grandes serán más influenciados por fuerzas inercial y gravitacional (en ausencia de fuerzas de flotación tales como turbulencia) ([Agarwal et al., 2013](#)).

Uso de la nanotecnología en la agricultura: Nanofertilizantes

Los nanofertilizantes son nutrimentos que se encuentran encapsulados mediante tres diferentes vías. En la primera, los nutrimentos son encapsulados dentro de materiales porosos; en la segunda, éstos son cubiertos con un capa delgada de un polímero; y en la tercera, los nutrimentos son liberados como partículas o emulsiones con dimensiones nanoescalares ([Rai et al., 2012](#)).

[Liu y Lal \(2014\)](#) sintetizaron nanopartículas de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) de aproximadamente 16 nm de tamaño y evaluaron el efecto de las nanopartículas (NPs) en soya (*Glycine max*) en medio inerte de cultivo (50 % de perlita y 50 % musgo de turba) a través de un experimento en invernadero. Los datos mostraron que la aplicación de nanopartículas incrementó la tasa de crecimiento y el rendimiento de semillas 33 % y 20 %, respectivamente, en comparación con aquellos con un fertilizante P regular [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$]. Los datos indicaron que las raíces de soya pueden absorber nanopartículas de hidroxiapatita como una fuente de P eficaz y mantener el crecimiento saludable y un rendimiento elevado.

Además de P, las nanopartículas también pueden haber suministrado Ca a las plantas.

El uso de las nanopartículas de hidroxiapatita como un nuevo tipo de fertilizante de fosfatado puede mejorar potencialmente el rendimiento agronómico y aumentar la eficiencia de la aplicación de P. Las nanopartículas de hidroxiapatita tienen interacciones mucho más débiles con componentes del suelo que los iones cargados de PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- o Ca^{2+} . Por lo tanto, una parte significativa de nanopartículas permanecen en la solución del suelo para que las raíces absorban mientras que la mayoría de los iones fosfato cargados de fertilizantes de P convencionales son a menudo adsorbidos por las partículas del suelo y no están disponibles para absorción por la planta (Liu y Lal, 2014).

Delfani *et al.* (2014) probaron la aplicación foliar de soluciones de nanopartículas de Mg (NP-Mg) y Fe (NP-Fe) en frijol caupí (*Vigna unguiculata*). Observaron que una combinación de 0.5 g L^{-1} de NP-Mg con 0.5 g L^{-1} de NP-Fe, aumentó el peso de 1000 semillas 7 % a partir de 216 g (sin Mg y Fe) a 232 g. Se obtuvo el mayor rendimiento (245 g, un aumento del 13.5 % en el mismo para el control) para un tratamiento que implica la combinación de 0.5 g L^{-1} de la sal regular de Fe y 0.5 g L^{-1} de NPs-Mg. Delfani *et al.* (2014) sugieren que las aplicaciones foliares de estos dos elementos aumentaron la eficiencia fotosintética de la planta. Sin embargo, la aplicación exclusiva de NPs-Mg disminuyó el rendimiento de 202 g (una disminución de aproximadamente 6 % en comparación el control). Pero, los autores observaron que la aplicación de NPs-Mg mejoró la absorción de Mg en

la planta de tallos y hojas en comparación con el uso de una sal regular de Mg, lo que sugiere una mayor disponibilidad y movilidad de las NPs-Mg.

Ghafariyan *et al.* (2013) informaron de que bajas concentraciones de nanopartículas de Fe super-paramagnético (NP-Fe) aumentó significativamente el contenido de clorofila en las hojas de soya sub-apicales en una prueba de invernadero bajo condiciones hidropónicas, lo que sugiere que la soya podría utilizar este tipo de NP-Fe como fuente de Fe y reducir los síntomas de la deficiencia de Fe (clorosis en hojas). El impacto de la utilización de NP-Fe fue similar a la de una fuente de Fe eficaz para las plantas (Fe-EDTA en concentraciones $< 45 \text{ mg L}^{-1}$).

Zhu *et al.* (2008) demostraron que nanopartículas de Fe_3O_4 fueron absorbidas por plantas de calabaza (*Cucurbita maxima*) mediante las raíces y translocadas a través de los tejidos de la planta. Al final del experimento se llevó a cabo un balance de masa y el estudio mostró que aproximadamente 45.5 % de las nanopartículas absorbidas se acumularon en las raíces y cerca de 0.6 % de las nanopartículas se detectaron en las hojas. Estos mismos investigadores pusieron a prueba las mismas condiciones del experimento, pero en frijol lima (*Phaseolus limensis*), sin embargo, no se observó absorción y transporte de nanopartículas de Fe_3O_4 .

Absorción y movimiento de nanopartículas en las plantas

La absorción de nanopartículas por las plantas es un campo de reciente estudio. La mayor parte de los datos corresponden a la etapa de germinación y cultivo en

desarrollo. Debido a que aún no están bien definidos los protocolos para la cuantificación de nanopartículas dentro de los tejidos, la discusión de la literatura actual revela que la absorción, translocación, y acumulación de nanopartículas dependen de la especie de la planta y el tamaño, tipo, composición química, funcionalización, y la estabilidad de las nanopartículas (Rico *et al.*, 2011).

La internalización de las nanopartículas en las plantas, se produce durante la endocitosis con la ayuda de una cavidad mediante la membrana plasmática. También pueden cruzar la membrana utilizando proteínas transportadoras o a través de los canales iónicos. En el citoplasma, las nanopartículas se pueden unir con diferentes orgánulos citoplasmáticos e interferir con los procesos metabólicos en ese sitio (Nair *et al.*, 2010).

Por otra parte, Kurepa *et al.* (2010) mencionan que existen varias posibles vías para la absorción de nanopartículas por las células vegetales. Los datos sugieren que las nanopartículas pueden entrar en las células de plantas mediante la unión a proteínas transportadoras, a través de las acuaporinas, canales de iones, mediante la creación de nuevos poros (exclusivo en nanotubos de carbono, los nanotubos crean o forman los poros para entrar a la célula) o mediante endocitosis. Las nanopartículas pueden formar complejos con transportadores de membrana o exudados de las raíces y posteriormente ser transportados. Una vez dentro de las células, las nanopartículas pueden ser transportadas apoplásticamente o simplásticamente. Sin embargo, los mecanismos exactos de por qué sólo algunas especies de plantas fácilmente absorben nanopartículas son aún desconocidos (Rico *et al.*, 2011).

Cuando las nanopartículas se aplican sobre la superficie de las hojas, entran a través de los estomas abiertos o a través de las bases de tricomas y luego son transportadas a diversos tejidos. Sin embargo, la acumulación de las nanopartículas en la superficie fotosintética pueden causar calentamiento foliar que se traduce en alteraciones en el intercambio de gases debido a la obstrucción en los estomas que producen cambios en diversas funciones fisiológicas y celulares de plantas (Eichert *et al.*, 2008).

En el contexto antes mencionado, este trabajo de tesis tiene como objetivos: (a) sintetizar nanopartículas biopoliméricas cargadas con fósforo y potasio (nanofertilizante) a partir del fertilizante convencional fosfato monopotásico, mediante la técnica de nanospray drying; (b) liberación de los macronutrientes de interés en las nanopartículas (P y K); y (c) evaluar los efectos de este nanofertilizante en el crecimiento, parámetros fotosintéticos, y la concentración y contenido nutrimental de P y K en plantas de arroz.

LITERATURA CITADA

- Agarwal M, Murugan M, Sharma A, Rai R, Kamboj A, Sharma H, Roy S. 2013. Nanoparticles and its toxic effects: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2(10): 76-82.
- Alemán F, Nieves-Cordones M, Martínez V, Rubio F. 2011. Root K⁺ acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. *Plant and Cell Physiology* 52(9): 1603-1612. Doi: 10.1093/pcp/pcr096
- Cordell D, Drangert JO, White S. 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19(2): 292-305. Doi: 10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009

- Corradini E, De Moura MR, Mattoso LHC. 2010. A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters* 4(8): 509-515. Doi: 10.3144/expresspolymlett.2010.64
- Delfani M, Firouzabadi MB, Farrokhi N, Makarian H. 2014. Some physiological responses of black-eyed pea to iron and magnesium nanofertilizers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45: 530-540. Doi: 10.1080/00103624.2013.863911
- Delgado-Ramos GC. 2014. Nanotechnology in Mexico: global trends and national implications for policy and regulatory issues. *Technology in Society* 37: 4-15. Doi: 10.1016/j.techsoc.2013.09.005
- Domínguez VA. 1997. *Tratado de fertilización*. Ed. Mundi-Prensa Libros, Madrid, España. 601 p.
- Eichert T, Kurtz A, Steiner U, Goldbach HE. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* 134(1): 151-160. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x
- Eljamal O, Khalil AM, Sugihara Y, Matsunaga N. 2016. Phosphorus removal from aqueous solution by nanoscale zero valent iron in the presence of copper chloride. *Chemical Engineering Journal* 293: 225-231. Doi: 10.1016/j.cej.2016.02.052
- European Commission Recommendation. 2016. Definition of nanomaterial. Disponible en línea en: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm. Consultado: octubre 17, 2016.
- European Commission Recommendation. Nanosciences, nanotechnologies, materials and new production technologies. 2011. Enabling and Industrial Technologies pave the way to a sustainable future. Disponible en línea en: https://ec.europa.eu/research/sse/2011/index_en.cfm?pg=nano Consultado: septiembre 28, 2016.

- FAO. World fertilizer trends and outlook to 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015. Disponible en línea en: www.fao.org/3/a-i4324e.pdf. Consultado: febrero 15, 2017.
- FDA, Food and Drug Administration. 2013. Nanotechnology Regulatory Science Research Plan. Disponible en línea en: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm273325.htm>. Consultado: junio 15, 2017.
- FDA, Food and Drug Administration. 2016. FDA's Approach to Regulation of Nanotechnology Products. Disponible en línea en: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm301114.htm>. Consultado: marzo 18, 2017.
- Foladori G. 2013. Nanotecnología: gestión y reglamentación de riesgos para la salud y medio ambiente en América Latina y el Caribe. *Trabalho, Educação e Saúde* 11(1): 145-167. Doi: 10.1590/S1981-77462013000100009
- Franco DPM, Manzano JQ, Cuevas AL. 2010. Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *ContactoS* 78: 25-33.
- Ghafariyan MH, Malakouti MJ, Dadpour MR, Stroeve P, Mahmoudi M. 2013. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. *Environmental Science and Technology* 47: 10645-10652. Doi: 10.1021/es402249b
- Gogos A, Knauer K, Bucheli TD. 2012. Nanomaterials in plant protection and fertilization: Current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(39): 9781-9792. Doi: 10.1021/jf302154y
- Hafsi C, Debez A, Abdelly C. 2014. Potassium deficiency in plants: effects and signaling cascades. *Acta Physiologiae Plantarum* 36(5): 1055-1070. Doi: 10.1007/s11738-014-1491-2
- Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* 15(6): 1692. Doi: 10.1007 / s11051-013-1692-4

- Kurepa J, Paunesku T, Vogt S, Arora H, Rabatic BM, Lu J, Smalle JA. 2010. Uptake and distribution of ultra small anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. Nano Letters 10(7): 2296-2302. Doi: 10.1021/nl903518f
- Liu R, Lal R. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). Scientific Reports 4: 5686-5691. Doi: 10.1038/srep05686
- Medina M, Galván L, Reyes R. 2015. Las nanopartículas y el medio ambiente. Universidad Ciencia y Tecnología 19(74): 49-58.
- Moharami S, Jalali M. 2014. Phosphorus leaching from a sandy soil in the presence of modified and un-modified adsorbents. Environmental Monitoring and Assessment 186(10): 6565-6576. Doi: 10.1007/s10661-014-3874-7
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Science 179(3): 154-163. Doi: 10.1016/j.plantsci.2010.04.012
- Norma Oficial Mexicana NMX-R-13830-SCFI-2014. 2015. Nanotecnologías. Guía para el etiquetado de nano-objetos manufacturados y de productos que contengan nano-objetos manufacturados. Diario Oficial de la Federación 15 de julio de 2015.
- Rai V, Acharya S, Dey N. 2012. Implications of nanobiosensors in agriculture. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology 3: 315-324. Doi: 10.4236/jbnp.2012.322039
- Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(8): 3485-3498. Doi: 10.1021/jf104517j
- Roberts TL. 2008. Improving nutrient use efficiency. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 32: 177-182.

- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116(2): 447-453. Doi: 10.1104/pp.116.2.447
- Shin R. 2014. Strategies for improving potassium use efficiency in plants. *Molecules and Cells* 37(8): 575-584. Doi: 10.14348/molcells.2014.0141
- Siddiqui MH, Al-Wahaibi MH. 2014. Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21(1): 13-17. Doi: 10.1016/j.sjbs.2013.04.005
- Wang Yi, Wu W.-H. 2013. Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 451-476. Doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120153
- Wu P, Shou H, Xu G, Lian X. 2013. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology* 16(2): 205-212. Doi: 10.1016/j.pbi.2013.03.002
- Zhu H, Han J, Xiao JQ, Jin Y. 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring* 10: 713-717. Doi: 10.1039/b8059

CAPÍTULO 1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS CARGADAS CON FÓSFORO Y POTASIO: CARACTERIZACIÓN Y PRUEBAS DE LIBERACIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

El uso de fertilizantes de lenta liberación se ha convertido en una tendencia para hacer un consumo más eficiente de estos insumos y reducir al mínimo la contaminación del ambiente ([Subbarao *et al.*, 2013](#)). Por lo que, los denominados nanofertilizantes han comenzado a cobrar relevancia en la agricultura, dado que se ha mostrado que las formulaciones nanoestructuradas incrementan la eficiencia en el uso de los fertilizantes y la tasa de absorción de nutrientes (eficiencia de absorción) desde el suelo; con lo que se reducen los costos de producción y los impactos negativos en el ambiente ([Srilatha, 2011](#); [Naderi y Danesh-Shahraki, 2013](#)).

Los nanofertilizantes están constituidos por nutrientes encapsulados dentro de una nanopartícula, tal proceso se logra mediante tres etapas. En la primera, los nutrientes son encapsulados dentro de materiales porosos; en la segunda, éstos son cubiertos con una capa delgada de un polímero; y en la tercera, los nutrientes son liberados como partículas o emulsiones con dimensiones nanoescalares ([Rai *et al.*, 2012](#)).

Los mecanismos de liberación en la agricultura son importantes para la aplicación de pesticidas y fertilizantes, así como el material genético para mejora de las plantas. Los sistemas de aplicación de plaguicidas deben centrarse en la

mejora de la eficacia y la gestión de la dispersión del rociado mientras que los fertilizantes se enfrentan a problemas de disponibilidad debido a la quelación en suelo, sobre-aplicación y escorrentías. Una alternativa viable para estos problemas es proporcionada por mecanismos de entrega controlada para la aplicación de pesticidas y fertilizantes. La liberación controlada apunta hacia la liberación dosificada de las cantidades necesarias y suficientes de agroquímicos en un período de tiempo, para obtener la eficacia biológica y reducir al mínimo los efectos perjudiciales. Para este propósito los polímeros se exploraron como vehículos de suministro de agroquímicos (Tsuji, 2001).

La selección del polímero para liberar un ingrediente activo durante un tiempo prolongado depende de varios factores, incluyendo la técnica de preparación, el tipo de reactivo y las condiciones experimentales del proceso. Un aspecto importante es que el polímero sea biodegradable para controlar la liberación de algún reactivo. Los materiales utilizados para la encapsulación clasifican en seis categorías que van de menor a mayor biodegradabilidad.

1. Almidón y mecanismo basados en el contenido de amilosa.
2. Celulosa y derivados, quitina, quitosano, dextrano y alginato.
3. Proteínas (caseína, albúmina, gelatina)
4. Materiales lipofílicos (gomas, ceras).
5. Polímeros sintéticos (alcohol polivinílico, poliláctico, poliglicólico, poliésteres, poliamidas, poliacrilamida).
6. Otros (polihidroxitirato, taninos, ligninas, resinas).

El polímero debe tener un peso molecular, temperatura de transición vítrea y estructura molecular adecuada para permitir la liberación. El polímero no debe reaccionar con el ingrediente activo. El polímero y sus productos de degradación no deben causar ningún tipo de contaminación al ambiente ([Cota-Arriola et al., 2013](#)).

Los polímeros biodegradables, tales como las proteínas, usados en la síntesis de nanopartículas pueden actuar como vehículos de administración de algún reactivo para una liberación controlada y selectiva. La molécula de gelatina está formada, en una relación aproximada 1:1:1, de grupos catiónicos (lisina y arginina), aniónicos (ácidos glutámico y aspártico) e hidrófobos (leucina, isoleucina, metionina y valina), el resto de la cadena la conforma la glicina, prolina e hidroxiprolina. La gelatina tipo A se obtiene mediante una hidrólisis ácida de colágeno del cerdo y la gelatina tipo B mediante hidrólisis alcalina del colágeno bovino ([Elzoghby, 2013](#)). El alginato es un polisacárido, que se presenta tanto como un componente estructural en las algas marinas como en bacterias en el suelo. Las aplicaciones industriales de los alginatos se encuentran principalmente en las industrias alimentaria, médica, farmacéutica y textil, y están relacionadas con su capacidad para retener el agua, así como sus propiedades gelificantes, viscosificantes y estabilizadoras. Su capacidad para retener grandes cantidades de fluido lo hacen muy adecuado como matriz de inmovilización para diversas aplicaciones, tales como el suministro de fármacos, genes o células para la ingeniería de tejidos y aplicaciones terapéuticas regenerativas ([Hecht y Srebnik, 2016](#)). En esta investigación se realizó la síntesis de nanopartículas cargadas con P y K a partir de KH_2PO_4 con polímeros

naturales (gelatina tipo B, gelatina tipo A y alginato de sodio), mediante la técnica de secado por aspersion a escala nano.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

En un primer ensayo se evaluó el empleo de gelatina B como polímero de recubrimiento. Para esto primeramente se pesaron 0.2 g de KH_2PO_4 grado reactivo (Productos Químicos de Monterrey, México.) y se disolvieron en 20 mL de agua desionizada; de manera simultánea se disolvieron 0.4 g de gelatina tipo B (SAFC, Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU) en 80 mL de agua desionizada a 120 °C. Ambas soluciones resultantes fueron pasadas a través de filtros PVC de 0.45 μM (Millipore, Cork, Irlanda) y mezcladas. La mezcla se mantuvo en agitación durante 60 min a una temperatura de 140 °C; posteriormente la solución se sonicó por 60 min usando un baño ultrasónico (TI-H-5, Elma, Alemania). Posterior a la sonicación se agregaron 4 mg de glutaraldehído (Merck, Darmstadt, Alemania) y la solución fue mantenida en agitación durante 20 h a temperatura ambiente. Finalmente, la solución fue sonicada nuevamente durante 60 min y filtrada con papel filtro Whatman 542 (Buckingham, Reino Unido) y mediante una membrana con diámetro de poro de 0.22 μm de PVC (Millipore, New York, EEUU), la primer filtración se realizó para eliminar impurezas y la segunda para eliminar aglomerados. Para la formación de las nanopartículas se empleó un Nano Spray Dryer B- 90 (Flawil, Suiza), utilizando una rejilla de 4 μm . La temperatura de secado dentro del equipo fue de 100 °C a una presión de 35 Mbar y 100 % de aspersion. El polvo resultante fue recogido de la base del equipo y almacenado para el análisis posterior de tamaño,

morfología, concentración y de liberación de P y K. El procedimiento anterior fue repetido usando solo el polímero (gelatina tipo B); es decir, para sintetizar nanopartículas sin carga (control negativo).

En un segundo ensayo se evaluó el empleo de la gelatina tipo A (Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU) como polímero de recubrimiento siguiendo la metodología descrita para la gelatina B; siendo la excepción el tiempo de agitación de la mezcla resultante entre la solución de KH_2PO_4 y la gelatina tipo A, que se incrementó a 180 min; así también la temperatura de secado dentro del equipo fue de 95 °C con un 85 % de aspersion.

Finalmente, en un tercer experimento se utilizó alginato de sodio (Sigma Aldrich, St. Louis EEUU) como polímero de recubrimiento, siguiendo la metodología indicada para la gelatina tipo A.

El tamaño y morfología de las nanopartículas obtenidas en los tres ensayos fueron evaluados utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) [JOEL modelo JSM--6390LV; Tokio, Japón]. Previamente, las muestras fueron recubiertas con oro-paladio mediante sputtering (Desk IV, Denton Vacuum). Las micrografías fueron tomadas a una magnificación de 7000X empleando un voltaje acelerador de 20 kV.

Dadas las características de morfología y tamaño observadas en las nanopartículas con el uso de gelatina tipo A y alginato de sodio como polímero

de recubrimiento, las determinaciones descritas a continuación solo se realizaron en estos dos tipos de partículas.

Para evaluar las posibles interacciones entre el KH_2PO_4 y los biopolímeros (alginato y gelatina tipo A) dentro de la nanopartícula, se realizaron determinaciones de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), utilizando el equipo Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU). Los análisis fueron realizados usando una celda de reflectancia total atenuada (ATR), en un rango de $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$, con una resolución de 4 cm^{-1} a los 32 scans.

Mediante un calorímetro diferencial de barrido, DSC Pyris 1 (Perkin Elmer, USA) fue empleado para determinar las propiedades térmicas de las nanopartículas y sus precursores. Muestras de 3 mg fueron pesadas en cápsulas de aluminio (No 0219-0062), y posteriormente selladas. La velocidad de calentamiento del equipo fue de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, en un intervalo de temperatura de $30\text{--}200^\circ\text{C}$. 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 fue utilizada como referencia.

La liberación de P y K en agua destilada se evaluó midiendo la concentración de estos elementos en las disoluciones resultantes de la adición en 25 mL de agua desionizada de 0.39 g del material encapsulado, 0.13 g de KH_2PO_4 grado reactivo y 0.26 g de nanopartículas sin carga. Las muestras se mantuvieron en agitación durante 30, 60, 90 y 120 min, se filtraron con papel filtro de poro medio

y se llevó a cabo la cuantificación de P y K en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-ES 725, Agilent, Mulgrave, Australia). En este análisis se consideraron también los polímeros y el KH_2PO_4 grado reactivo utilizado en el proceso de síntesis.

Con el objetivo de favorecer la liberación de P y K de la matriz polimérica, en otro experimento se adicionaron las enzimas tripsina y α -amilasa a las soluciones de nanopartículas de gelatina y alginato, respectivamente (Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU), enzima serina proteasa del páncreas con especificidad de sustrato sobre las cadenas laterales de lisina y arginina con carga positiva. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces éster, amida y de péptidos en el lado carboxilo de la arginina, lisina y ornitina. En las nanocápsulas de alginato de sodio se adicionó la enzima α -amilasa (Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU). Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 en el almidón y otros carbohidratos relacionados. El sitio activo tiene un gran número de grupos cargados, entre los que se encuentran tres ácidos (Asp231, Glu261 y Asp328, numerados según la secuencia BLA) esenciales para la actividad catalítica. Se pesaron por separado 1.5 g de nanopartículas de gelatina tipo A y alginato de sodio, y se disolvieron en 200 mL de agua desionizada. Las soluciones resultantes se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente. En las primeras 72 h se realizaron determinaciones de concentración de P y K en intervalos de 24 h. Después de 72 h se adicionó a las soluciones la enzima correspondiente a una concentración de 0.4 mg mL^{-1} , las soluciones se mantuvieron en agitación y se tomaron muestras en intervalos de 10 min durante los 30 min posteriores, para la determinación de la concentración de P y K, usando el equipo espectroscopia de

emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-ES 725, Agilent, Mulgrave, Australia).

Con los resultados de la concentración de P y K después de la solubilización en agua destilada, así como con los de concentración después de la adición de enzimas, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Tamaño y morfología de nanopartículas

Las micrografías del SEM muestran que las nanopartículas de gelatina tipo B cargadas con KH_2PO_4 presentaron una morfología cuasi esférica (**Figura 1.1A**). Así también se observa que el tamaño de las nanopartículas osciló desde 100 hasta 1400 nm, con diámetro medio de 755 nm. El 50 % de las partículas de la muestra analizada tuvieron un tamaño menor o igual a 680 nm (**Figura 1.1B**).

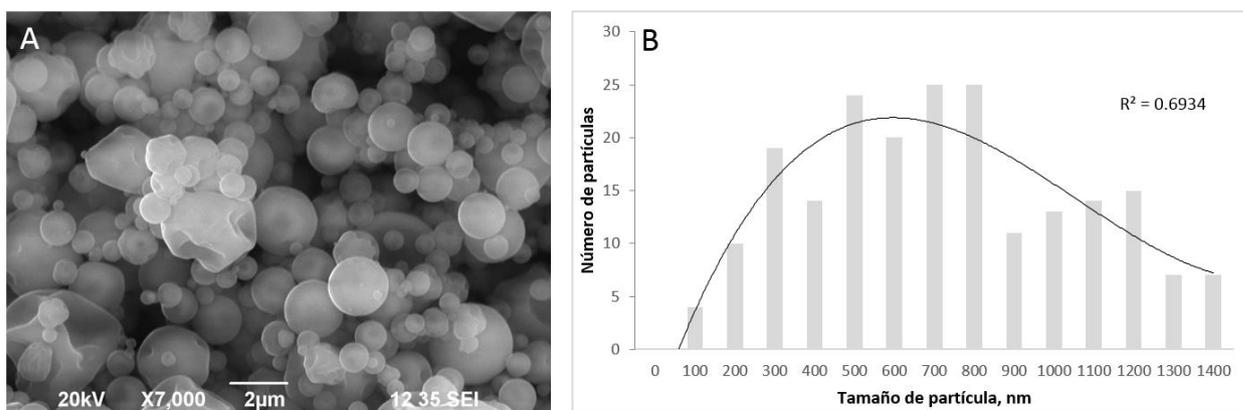


Figura 1.1. Micrografía de nanopartículas con gelatina tipo B (A) e histograma de distribución de tamaño de partícula (B).

Por otro lado, el empleo de gelatina A ocasionó la formación de partículas más uniformes en cuanto a morfología y tamaño (**Figura 1.2A**). El tamaño de las nanopartículas en este segundo ensayo osciló en un intervalo de 100 a 1100 nm, lo que hace evidente la reducción en el tamaño medio de las partículas, con un valor promedio de 615 nm; así también se advierte que el 90 % de las nanopartículas, se concentró en el intervalo de tamaño de 100 a 800 nm (**Figura 1.2B**).

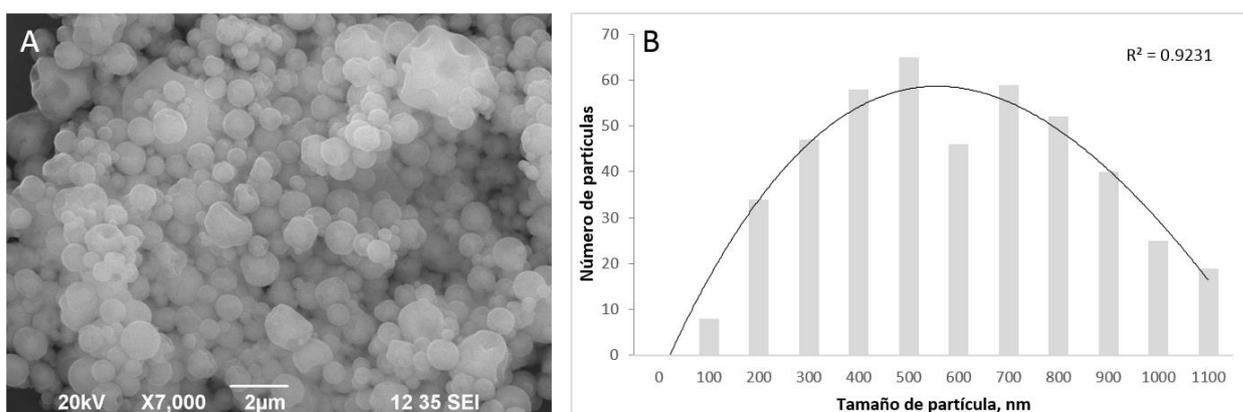


Figura 1.2. Micrografía de nanopartículas con gelatina tipo A (A) e histograma de distribución de tamaño de partícula (B).

Con el empleo de alginato de sodio como polímero, se observó la formación de partículas esféricas (**Figura 1.3A**) con tamaños que oscilaron entre 100 a 1200 nm, con diámetro medio de 526 nm. Al igual que con el uso de la gelatina A, se observa una concentración importante por tamaño de nanopartículas a valores menores o iguales de 800 nm, siendo en este caso del 87 % (**Figura 1.3B**).

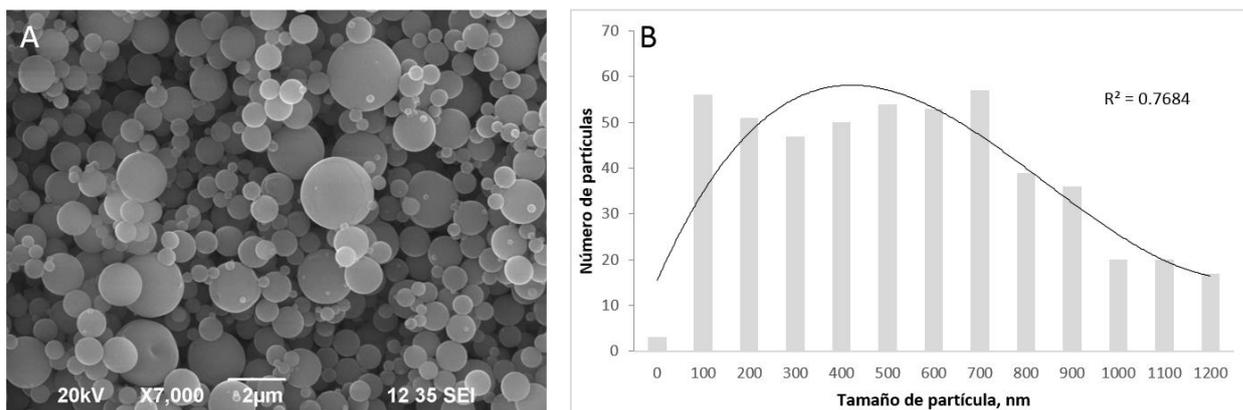


Figura 1.3. Micrografía de nanopartículas con alginato de sodio (A) e histograma de distribución de tamaño de partícula (B).

1.3.2. Evaluación de las interacciones entre el KH_2PO_4 y los biopolímeros

La **Figura 1.4** muestra los espectros FTIR de las nanopartículas de alginato cargadas con fertilizante ($\text{NPAIlg-KH}_2\text{PO}_4$) y de sus componentes individuales. 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 otro lado, el espectro de KH_2PO_4 presentó bandas características a 2321 cm^{-1} (vibración de tensión del enlace O–H), 1270 cm^{-1} (vibración de flexión del enlace O–H), 1050 cm^{-1} y 830 cm^{-1} (vibraciones de tensión del PO_4). Al analizar los espectros de las nanopartículas con y sin carga (NPAIlg) se pudieron observar modificaciones en algunas bandas características. La banda relacionada con la vibración de flexión del enlace O–H (1270 cm^{-1}) del KH_2PO_4 no se visualiza en el espectro de las $\text{NPAIlg-KH}_2\text{PO}_4$. Por su parte, la banda relacionada 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 cual sugiere un aumento en los grupos C–O–C. Lo anterior hace suponer que el glutaraldehído no solo favoreció las interacciones fertilizante-alginato, sino también promovió la formación de enlaces químicos entre cadenas poliméricas del polisacárido.

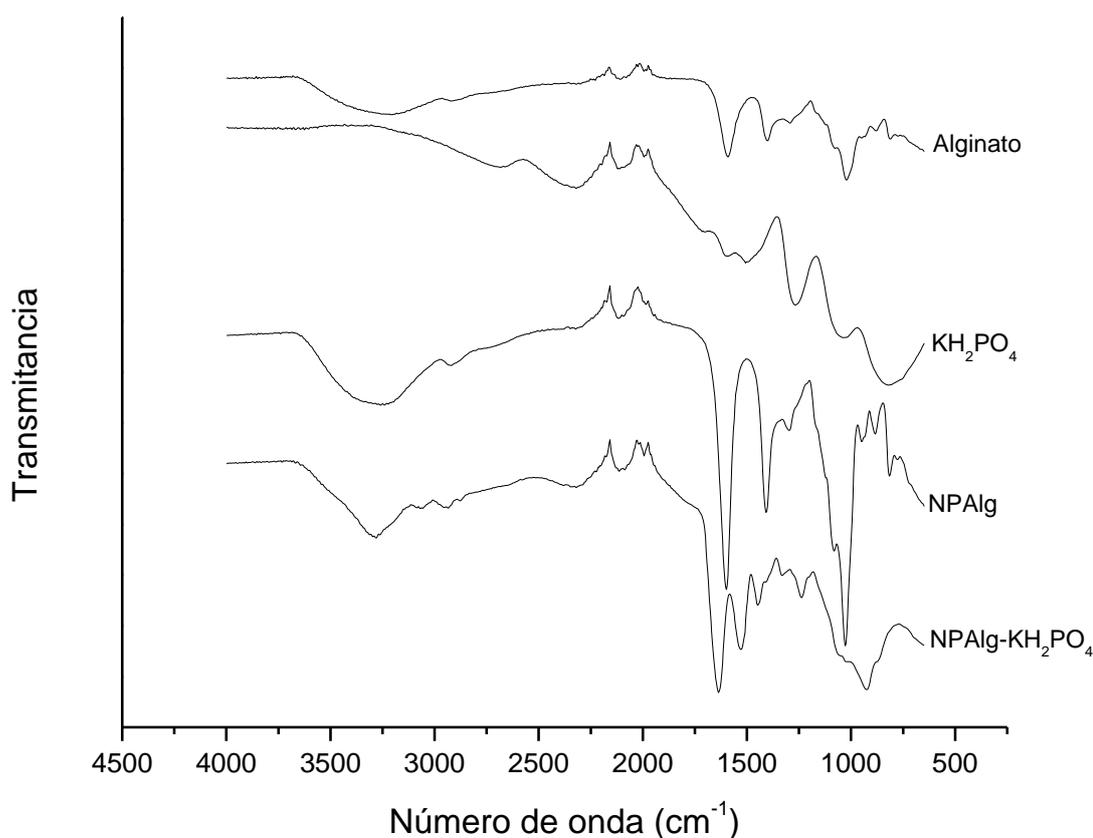


Figura 1.4. Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de alginato, KH₂PO₄, nanopartículas de alginato (NPAIg) y nanopartículas de alginato cargadas con KH₂PO₄ (NPAIg KH₂PO₄).

Por otro lado, el espectro de la gelatina tipo A (Gelatina A) (**Figura 1.5**) reveló bandas de absorción características a 3275 cm⁻¹, correspondiente a la amida A (vibraciones de tensión del enlace N-H), 1632 cm⁻¹ perteneciente a la amida I

(vibraciones de tensión del enlace C=O), 1524 cm^{-1} correspondiente a la amida II (vibraciones de flexión del enlace N-H y de tensión del enlace C-N) y finalmente a 1240 cm^{-1} , la cual es característica de la amida III (vibraciones de flexión del enlace N-H).

En los espectros de las nanopartículas de gelatina con (NPGA-KH₂PO₄) y sin carga (NPGA), se observa ausencia de la banda perteneciente a las vibraciones de flexión del enlace O-H en el H₂PO₄ (1270 cm^{-1}). De igual manera no es posible visualizar las bandas ubicadas a 1050 cm^{-1} y 830 cm^{-1} en el espectro del KH₂PO₄, ya que aparecen ahora como una sola banda ensanchada y con desplazamiento a mayores valores de número de onda. Las bandas pertenecientes a los grupos amida de la gelatina también sufrieron ligeros desplazamientos a mayores valores de números de onda y disminución en las intensidades. De la misma manera que con el alginato, el glutaraldehído favoreció la formación de enlaces entre los grupos -OH y amino de la gelatina, y el KH₂PO₄.

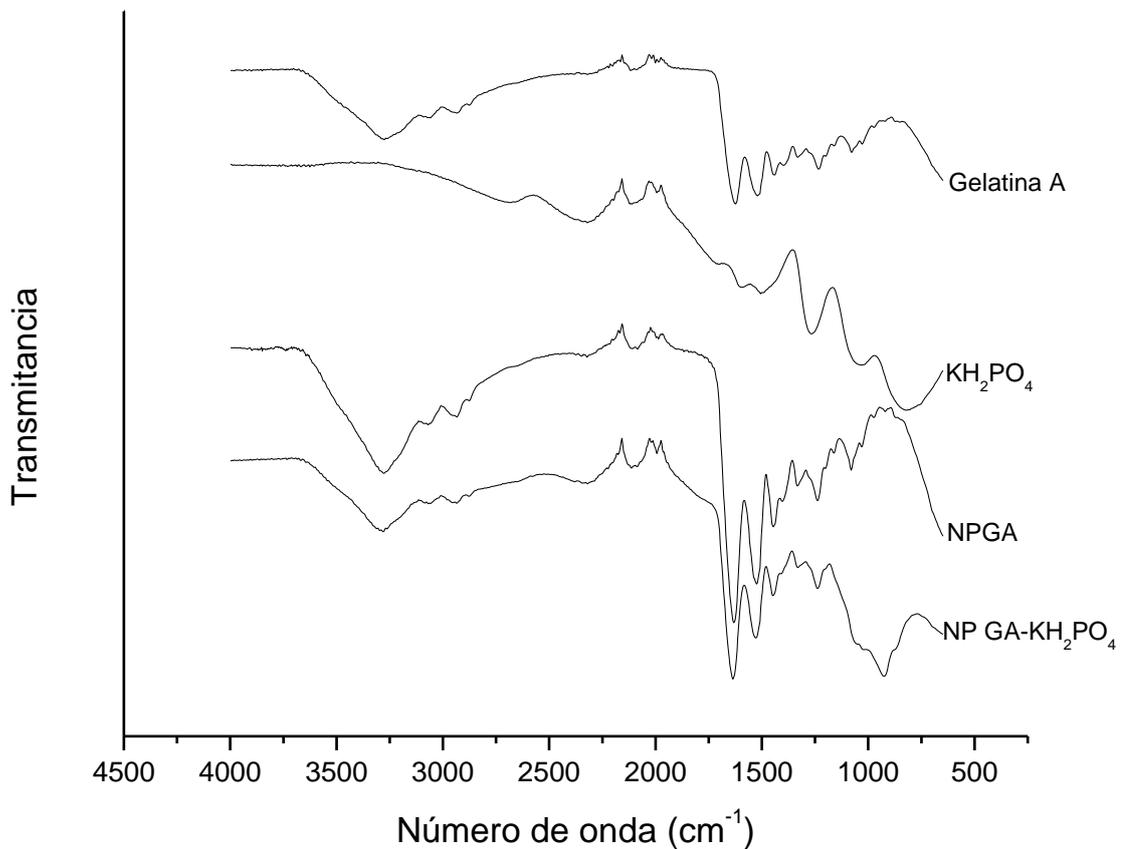


Figura 1.5. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de gelatina tipo A (Gelatina A), KH_2PO_4 , nanopartículas de gelatina tipo A (NPGA) y nanopartículas de gelatina tipo A cargadas con KH_2PO_4 (NPGA- KH_2PO_4).

1.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la **Figura 1.6** se muestran los termogramas del fertilizante (KH_2PO_4), nanopartículas de gelatina tipo A (NPGA), gelatina tipo A cargadas con fertilizante (NPGA- KH_2PO_4), alginato (NPAIg) y alginato cargadas con fertilizante (NPAIg- KH_2PO_4).

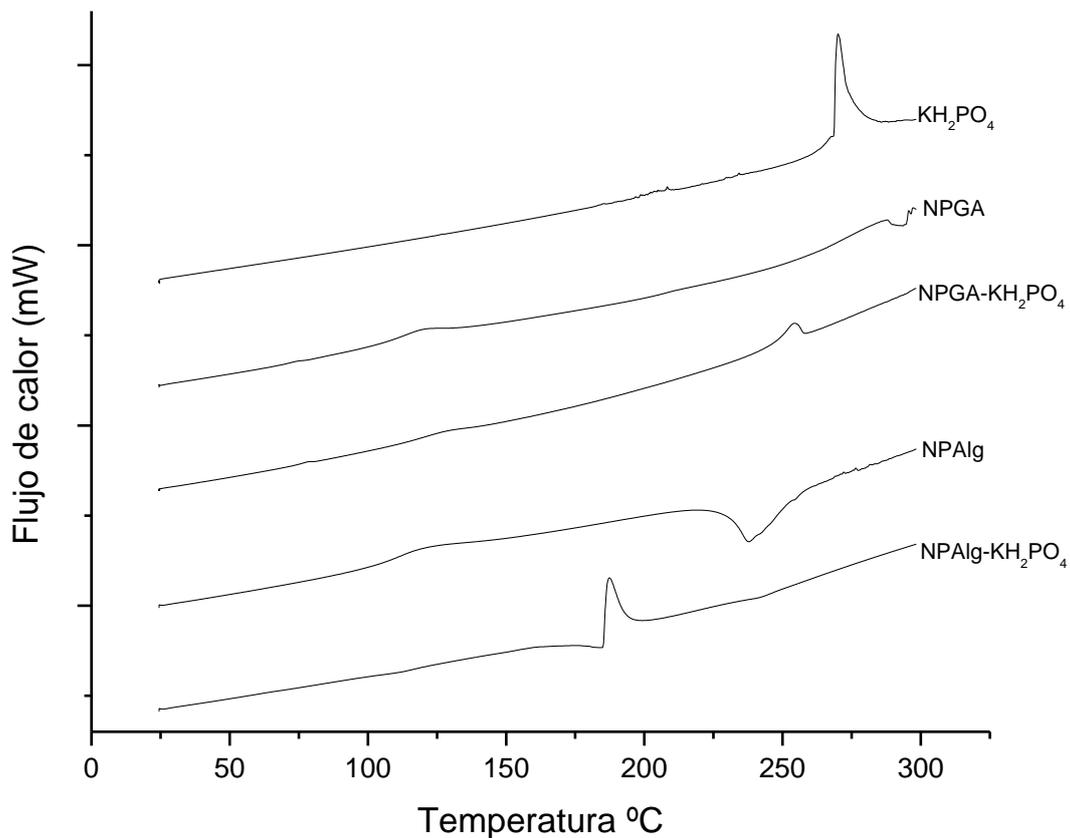


Figura 1.6. Termograma del fertilizante (KH_2PO_4), nanopartículas de gelatina tipo A (NPGA), gelatina tipo A cargadas con fertilizante (NPGA- KH_2PO_4), nanopartículas de alginato (NPAIg) y alginato cargadas con fertilizante (NPAIg- KH_2PO_4).

En el **Cuadro 1.1** se presentan la temperatura de fusión (T_{peak}) y transición vítrea (T_g). La temperatura de transición vítrea se refiere a la temperatura la cual el polímero se ablanda debido al inicio del movimiento molecular a una estructura desordenada (amorfa) (Chuaynukul *et al.*; 2014). La T_{peak} de KH_2PO_4 se presenta a 273.03 °C y una entalpia de 682.22 J/g. En las NPGA y NPGA- KH_2PO_4 la T_g es de 73.17 y 79.97, T_{peak} de 120.01 y 128.69 °C respectivamente. Tanto en los valores de T_g y T_{peak} se exhibe un aumento de temperaturas cuando las

nanopartículas de gelatina están cargadas de KH_2PO_4 . Mientras que la T_{peak} del KH_2PO_4 en las NPGA- KH_2PO_4 disminuye a 253.84 °C.

Cuadro 1.1. Temperatura de fusión (T_{peak}), transición (T_g) y entalpia (ΔH) de nanopartículas de gelatina tipo A y alginato con carga y sin carga de KH_2PO_4 .

Muestra	KH_2PO_4				Polímero				
	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	T_{end} (°C)	ΔH (J/g)	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	T_{end} (°C)	T_g (°C)	ΔH (J/g)
KH_2PO_4	271.58	273.03	278.04	682.22					
NPGA					105.29	120.01	140.03	73.17	64.34
NPGA- KH_2PO_4	247.91	253.84	257.7	60.48	116.4	128.69	143.29	79.97	25.46
NPAIg					104.98	120.84	139.02	89.86	66.8
					§229.34	237.85	254.36		-369.95
NPAIg- KH_2PO_4	185.67	187.32	193.36	134.69	185.67	187.32	193.36	134.69	2.99
					§236.36	245.85	258.07		-27.49

§Datos del proceso de carbonización del alginato

Por otro lado, las NPAIg y las NPAIg- KH_2PO_4 exhiben una T_g de 89.86 y 134.69, una T_{peak} de 120.84 y 187.32, respectivamente. En ambas muestras se exhibe un pico exotérmico con una T_{peak} de 237.85 °C para NPAIg y 245.85 °C en las NPGA- KH_2PO_4 esto se debe a reacciones de deshidratación y despolimerización probablemente por una descarboxilación parcial de los grupos carboxílicos protonados liberando CO_2 , alterando la estructura química del polímero (Bagre *et al.*, 2013).

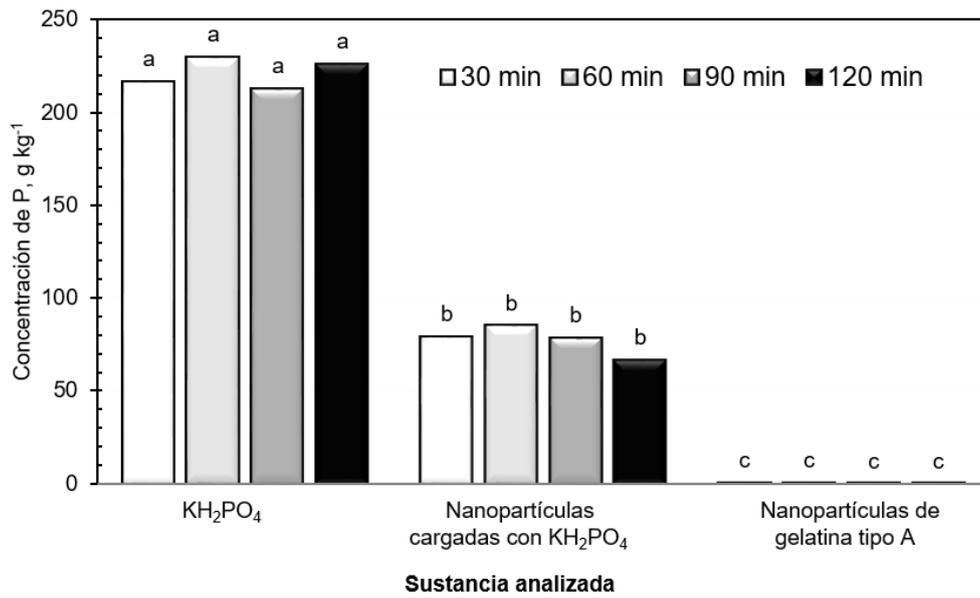
En relación a la T_{peak} del KH_2PO_4 cuando se combina con los polímeros (NPGA- KH_2PO_4 y NPAIg- KH_2PO_4), exhibe un valor menor posiblemente a las interacciones con el polímero y el glutaraldehído (agente cross-linking). En

particular, el termograma de las NPAIg-KH₂PO₄ exhibe un solo pico endotérmico, a diferencia de las NPGA-KH₂PO₄ que muestra dos picos endotérmicos con valores mencionados anteriormente, las NPAIg-KH₂PO₄ posiblemente están formando una nueva estructura química, por ello el T_{peak} del KH₂PO₄ y del polímero tienen el mismo valor (187.32 °C).

1.3.4. Concentración de P y K

En la **Figura 1.7** se presentan los resultados de la concentración de P y K obtenidos de la liberación en intervalos de 30 min durante 2 h; mediante la disolución de nanocápsulas de gelatina tipo A en agua destilada. También se presentan los resultados de los controles positivo (KH₂PO₄ grado reactivo usado para la síntesis) y el negativo (gelatina tipo A). Como se esperaba, la mayor concentración de P y K se encontró en el testigo positivo (KH₂PO₄), sin cambios estadísticamente significativos entre tiempos de muestreo, y con valores medios de 221.45 (**Figura 1.7A**) y 297.55 (**Figura 1.7B**) g kg⁻¹, respectivamente.

A).



B).

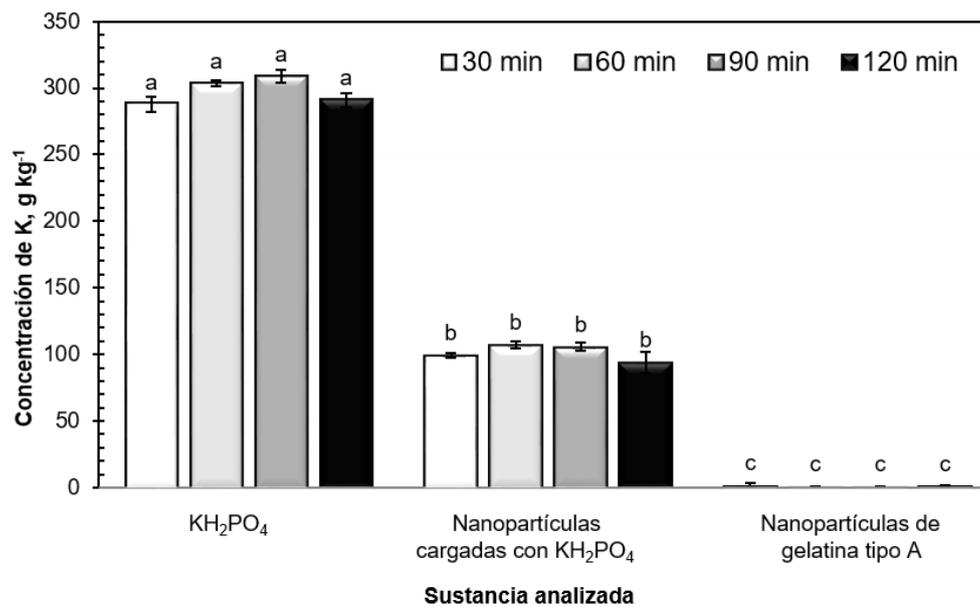


Figura 1.7. Concentración de P (A) y K (B) en KH₂PO₄, en pruebas de liberación, usando KH₂PO₄, nanopartículas con gelatina tipo A cargadas con KH₂PO₄ y polímero gelatina tipo A, disueltos en agua destilada después de diferentes tiempos de agitación. Medias ± DE con letra distinta en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

En las nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 , se tuvo la misma tendencia que en el reactivo, no hay diferencias estadísticas en los tiempos de muestreo, y las concentraciones promedio de P y K fueron inferiores a la del reactivo con valores de 77.5 y 101.5 g kg^{-1} , respectivamente. En el caso del testigo negativo (polímero gelatina tipo A) se observaron concentraciones de P y K de 1.2 y 0.2 g kg^{-1} , respectivamente (**Figura 1.7**).

En los resultados de las pruebas de liberación realizados en las nanopartículas de alginato de sodio (**Figura 1.8**), se observan tendencias y concentraciones similares a las obtenidas en las nanopartículas con gelatina tipo A (**Figura 1.8**). En el KH_2PO_4 se registraron promedios de P y de K de 212.6 y 301.5 g kg^{-1} , respectivamente; en ambos elementos con concentración menor en la evaluación realizada a los 30 min. En el caso de las nanopartículas cargadas, las concentraciones medias de P y K fueron de 71.1 y 94.8 g kg^{-1} , respectivamente, sin cambios significativos entre tiempos de muestreo. Así también en el alginato de sodio, las concentraciones de P y K son casi nulas (**Figura 1.8**).

Con los dos polímeros empleados en el recubrimiento (**Figuras 1.7 y 1.8**), las nanopartículas cargadas liberaron cerca de un tercio del P y K que contenían.

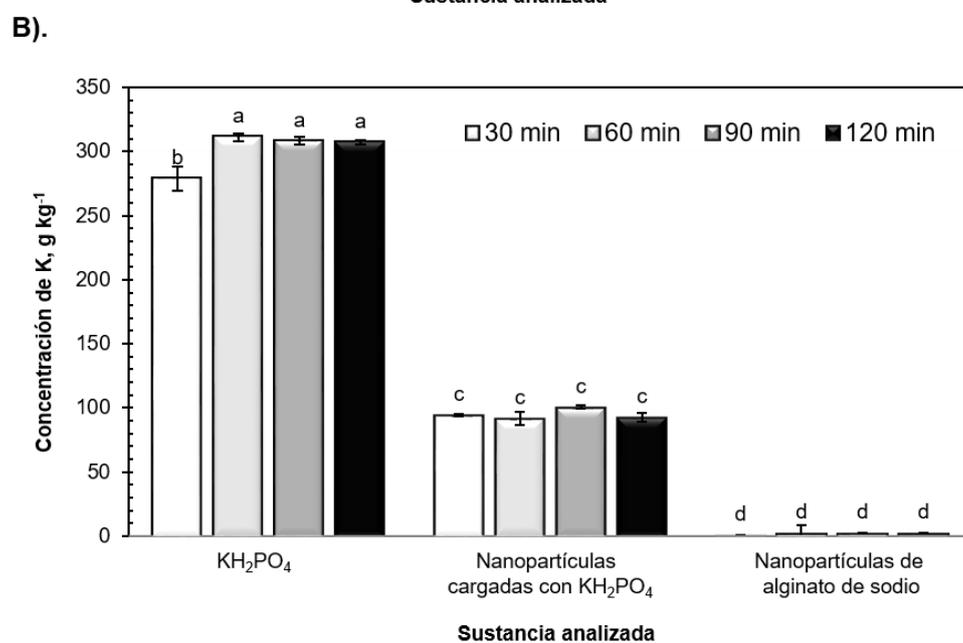
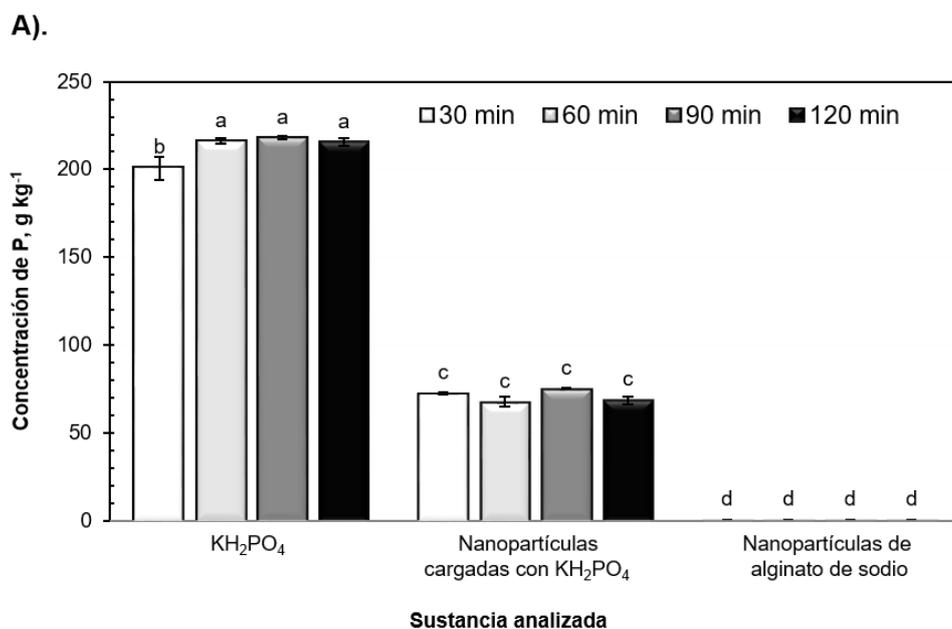


Figura 1.8. Concentración de P (A) y K (B) en KH_2PO_4 , en pruebas de liberación, usando KH_2PO_4 en nanopartículas recubiertas con alginato de sodio cargadas con KH_2PO_4 y en el polímero alginato de sodio, disueltos en agua destilada después de diferentes tiempos de agitación. Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

1.3.5. Liberación de P y K con adición de enzimas

En las nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 y gelatina tipo A, se adicionó la enzima tripsina después de 72 h de agitación en agua destilada. Previo a la adición de la enzima se evaluaron concentraciones de P y K a las 24, 48 y 72 h (**Figura 1.9**), estos resultados corroboraron los obtenidos en la fase previa (**Figuras 1.7 y 1.8**). 5, 15, 25 y 30 min posteriores a la adición de la enzima se evaluaron las concentraciones de P y K (**Figura 1.9**). En el muestreo realizado después de 5 min de la adición de la tripsina, la concentración tanto de P incrementó en 3 veces, mientras que la de K en 2.6 veces; en ambos casos en comparación con la media de concentración obtenida sin la adición de la enzima (24, 48 y 72 h). En las mediciones realizadas a los 15, 25 y 35 min después de la adición de la tripsina, no se observan cambios importantes en las concentraciones de P y K (**Figura 1.9**).

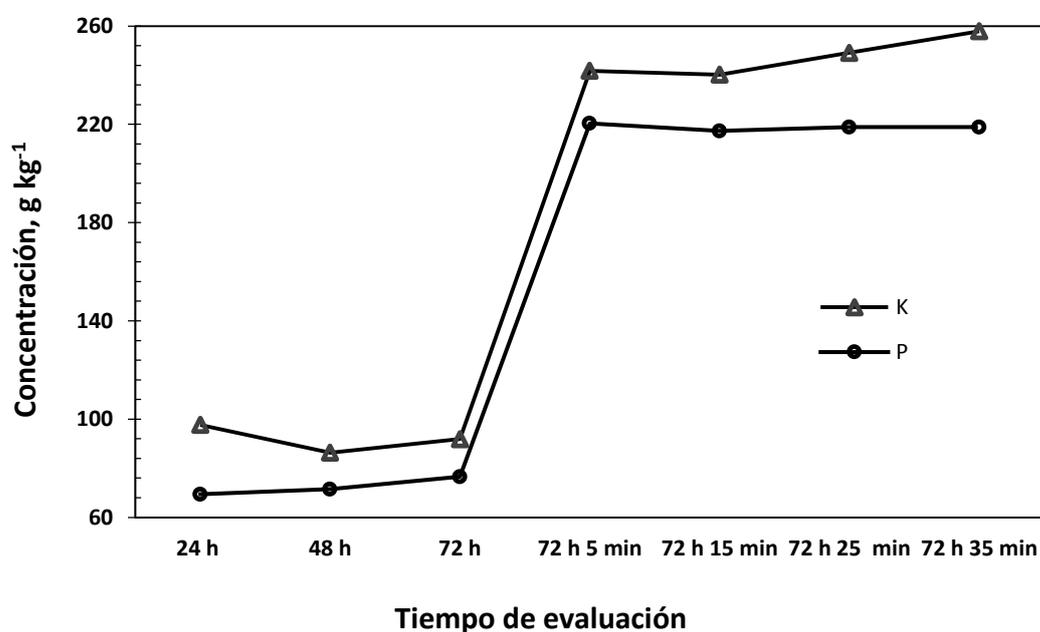


Figura 1.9. Liberación de P y K de nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 , y gelatina tipo A sin y con adición de la enzima tripsina.

En la prueba de liberación de P y K en nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 y alginato de sodio se usó la enzima α -amilasa. Previo a la adición de la α -amilasa, la concentración de P tuvo un valor de 74.7 g kg^{-1} ; así también la concentración de K fue estable con un valor medio de 109 g kg^{-1} (**Figura 1.10**). Después de 5 min de la adición de la α -amilasa, se observan incrementos en la concentración de P y de K en cerca de 1.3 y 1.1 veces, respectivamente (**Figura 1.10**).

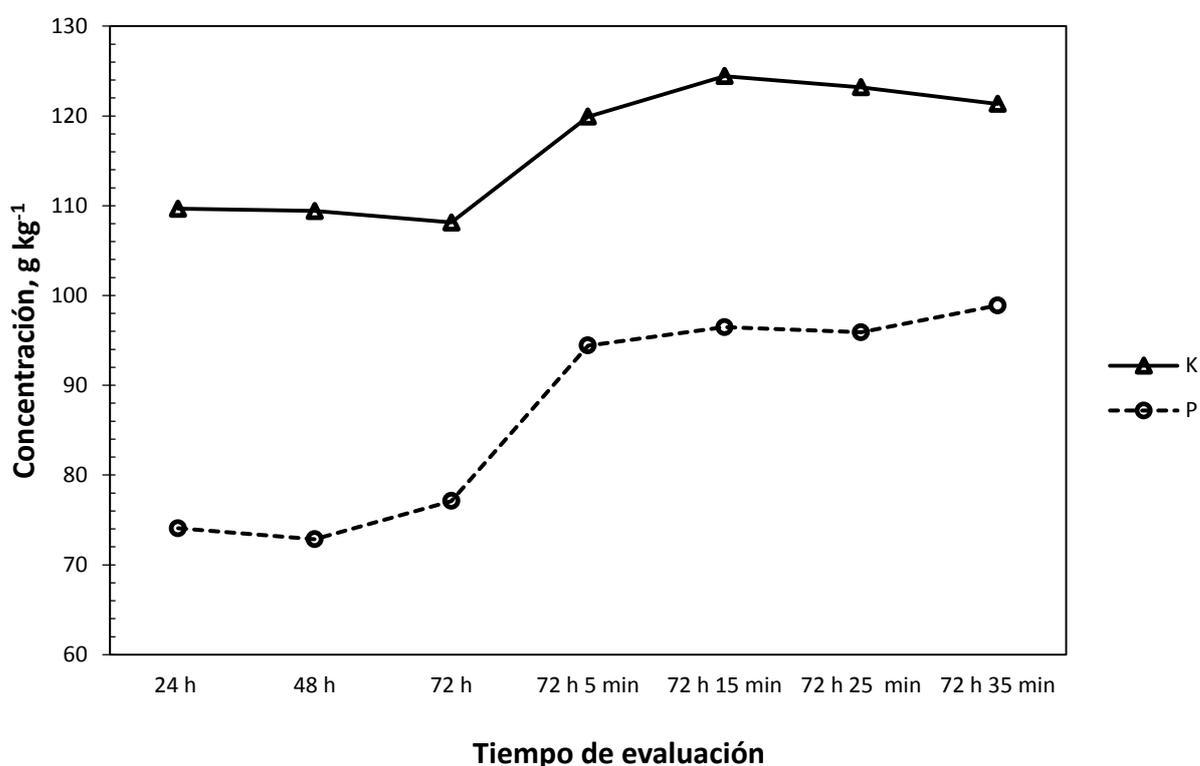


Figura 1.10. Liberación de P y K de nanopartículas cargadas con KH_2PO_4 y alginato de sodio sin y con adición de la enzima α -amilasa.

La enzima α -amilasa fue menos eficiente en la liberación de P y K en nanopartículas y alginato de sodio que la tripsina a partir de nanopartículas de gelatina tipo A (**Figuras 1.9 y 1.10**).

1.4. DISCUSIÓN

Las nanopartículas se describen comúnmente como partículas coloidales sólidas, que van en tamaño desde 10 nm a 1000 nm (Li *et al.*, 2010). Por otro lado, la nanotecnología ha mostrado un desarrollo potencial principalmente en el área de la electrónica y la medicina. Sin embargo, podría proporcionar soluciones a los problemas agrícolas causados al ambiente mediante fertilizantes, plaguicidas y pesticidas convencionales (Morrissey, 2006).

Harsha (2013) reportó el diseño de nanopartículas de gelatina cargadas con amoxicilina usando el Nano Spray Dryer B-90 Büchi, y mencionó que éste es un método de secado suave y es eficiente, rápido, continuo y escalable por el cual se puede transformar líquidos a polvos secos con altos rendimientos. Las nanopartículas obtenidas en este ensayo muestran una morfología corrugada, similares a las obtenidas en esta investigación (**Figuras 1.1 y 1.2**). Se reporta que dicha morfología puede ser debida al rápido secado durante la pulverización, y ésta podría ser ventajosa, ya que se traduce en una mayor área superficial. Las nanopartículas de gelatina cargadas con amoxicilina tienen una distribución de tamaños de partícula heterogénea. Este resultado concuerda con los obtenidos con gelatina tipo B con un intervalo en tamaño de 100 a 1400 nm, mientras que en gelatina tipo A oscila entre 100 y 1100 nm. Esto es importante porque, cuando las partículas son de tamaño uniforme, el espaciado es más grande, pero cuando se utiliza una gama de tamaños, los espacios vacíos se llenan por las nanopartículas más pequeñas. El diámetro medio de las nanopartículas de amoxicilina, de acuerdo con Harsha (2013) resultó de 571 nm, mientras que las nanopartículas de gelatina tipo A y B cargadas con KH_2PO_4

fueron en promedio de 755 y 615 nm, respectivamente. Así también el valor de ajuste con una $R^2 = 0.69$ en las nanopartículas de gelatina tipo B, nos muestra que el modelo explica el 69 % del fenómeno entre la relación del tamaño de la partícula con el número de partículas (**Figura 1.1B**). En las nanopartículas de gelatina tipo A, la relación es más alta ya que la R^2 es de 0.92 lo cual implica que hay una mayor cantidad de variación total explicada por el modelo propuesto (**Figura 1.2B**). Finalmente, para las nanopartículas de alginato el modelo de predicción fue alto con una $R^2 = 0.77$ (**Figura 1.3B**).

En contraste, [Hasaneen et al. \(2014\)](#), al sintetizar nanopartículas de quitosano mediante polimerización de ácido metacrílico en un proceso de dos pasos obtuvo nanopartículas cargadas de NPK esféricas con una distribución de tamaño homogéneo de 20 ± 2 nm. De igual manera [Corradini et al. \(2010\)](#) sintetizó nanopartículas de quitosano mediante la polimerización de ácido metacrílico para la incorporación de fertilizantes NPK, usando como fuentes el fosfato de calcio $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ y cloruro de potasio (KCl). Las nanopartículas mostraron una forma esférica con una distribución de tamaño homogénea. El diámetro medio de las nanopartículas de quitosano (en estado seco) fue de aproximadamente 78 ± 1.5 nm.

En el análisis de FTIR el espectro del KH_2PO_4 presentó bandas características que coinciden con lo descrito por [Hayashi y Mukamel \(2008\)](#), también el espectro de NPAIlg mostró bandas características ([Domingos et al., 2006](#); [Bagre et al., 2013](#)).

Uno de los principales mecanismos de la absorción por el sistema radical de la planta es a través de la disolución de nanopartículas en la solución del suelo, en otras palabras, las nanopartículas simplemente se disuelven en solución y liberan el nutrimento como iones solubles (DeRosa *et al.*, 2010).

La liberación controlada de fertilizantes es uno de los medios para minimizar la pérdida de fertilizantes. Esto se puede lograr mediante el uso de diferentes tipos de recubrimientos de poliméricos. En comparación con los fertilizantes convencionales, su patrón gradual de la liberación de nutrimentos se ajusta mejor a las necesidades de la planta, reduce al mínimo la lixiviación, y por lo tanto mejora la eficiencia del uso de fertilizantes (Subbarao *et al.*, 2013).

En un estudio con un biofertilizante de nanopartículas de hidroxiapatita con urea, presentó una liberación fuerte al inicio, seguido por una liberación lenta, en el transcurso de 60 días en comparación con el fertilizante comercial, que liberó fuertemente al inicio, seguido por una liberación lenta y no uniforme durante 30 días (Kottegoda *et al.*, 2011).

Nanopartículas de sílice con diámetros de partícula de ~150 nm y tamaños de poro ~ 2.5 nm fueron sintetizados a través del mecanismo de plantillas de cristal líquido. Se usó urea, como una molécula de agroquímicos modelo, fue atrapado en los poros del material silíceo por simple inmersión de carga utilizando soluciones acuosas de urea. La capacidad de adsorción total de nanopartículas de sílice podría alcanzar hasta 80 % (w/w). El proceso de liberación de las nanopartículas de sílice cargadas de urea reveló al menos una mejora de cinco

veces en el período de liberación. Esto debido a la capacidad de atrapar moléculas de urea en sus poros y liberarlos de forma controlada, nanopartículas de sílice demostraron su gran potencial como nanotransportador para productos agroquímicos (Wanyika *et al.*, 2012).

Leo *et al.* (1997) investigaron la fracción liberada de nanopartículas de gelatina tipo A cargadas con doxorubicina (DXR) y estabilizadas con glutaraldehído. De acuerdo con el estudio *in vitro* sólo un poco de DXR fue lanzado como fármaco libre (8 %) cuando las nanopartículas se pusieron en solución salina. La concentración de DXR se determinó espectrofotométricamente (Lambda 3B, Perkin Elmer) a 480 nm. Después de 72 h, se añadieron 10 mg de enzimas proteolíticas (tripsina, α -quimotripsina y proteasa). A intervalos de tiempo predeterminados (10 y 20 min, 1, 4, 12 y 24 h) se tomó una alícuota de 2 mL y se determinó la concentración de DXR espectrofotométricamente. La degradación por la proteasa indujo la liberación de un 10 % del fármaco cargado, mientras que α -quimotripsina y tripsina permite una mayor cantidad de DXR para ser lanzado (15 y 20 %, respectivamente).

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos al agregar tripsina a nanopartículas cargadas con fosfato monopotásico y gelatina tipo A, donde la concentración tanto de P incrementó en 3 veces, mientras que la de K en 2.6 veces; en ambos casos en comparación con la media de concentración obtenida sin la adición de la enzima (24, 48 y 72 h). Mientras que con la adición α -amilasa a nanopartículas de alginato de sodio, se observan incrementos en la concentración de P y de K de 1.3 y 1.1 veces, respectivamente.

1.5. CONCLUSIONES

En el presente estudio las nanopartículas cargadas con fosfato monopotásico que tuvieron menor diámetro y mejor formación esférica fueron con alginato de sodio.

Las pruebas de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) señalan que existe una interacción electrostática y puentes de hidrógeno entre el KH_2PO_4 y los polímeros (alginato de sodio y gelatina tipo A).

En las pruebas de liberación, la adición de tripsina fue la que indujo una mayor liberación de P y K en las nanopartículas de gelatina tipo A. Mientras que en las nanopartículas de alginato de sodio, α -amilasa mostró menor liberación de P y K, por lo que para aumentar dicha liberación se sugiere usar la enzima alginatoliasa que es específica para la degradación dicho polímero.

La síntesis de nanopartículas cargadas con fosfato monopotásico podría ser una técnica con beneficios como la liberación controlada de P y K como fuente de nutrimentos para las plantas, actuar de manera más eficiente y reducir la contaminación ecológica que causan los fertilizantes tradicionales.

1.6. LITERATURA CITADA

Bagre AP, Jain K, Jain NK. 2013. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: *In vitro* and *in vivo* assessment. International Journal of Pharmaceutics 456: 31-40. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.08.037 10.1016/j.ijpharm.2013.08.037

- Chuaynukul K, Prodpran T, Benjakul S. 2014. Preparation, thermal properties and characteristics of gelatin molding compound resin. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences* 2(4): 1-9.
- Corradini E, De Moura MR, Mattoso LHC. 2010. A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters* 4(8): 509-515. Doi:10.3144/expresspolymlett.2010.64
- Cota-Arriola O, Onofre Cortez-Rocha M, Burgos-Hernández A, Marina Ezquerra-Brauer J, Plascencia-Jatomea M. 2013. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(7): 1525-1536. Doi: 10.1002/jsfa.6060
- DeRosa MC, Monreal C, Schnitzer M, Walsh R, Sultan Y. 2010. Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnology* 5(2): 91. Doi:10.1038/nnano.2010.2
- Domingos FB, 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. Doi: 10.1016/j.carbpol.2006.02.008
- Elzoghby AO. 2013. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release* 172(3): 1075-1091. Doi: 10.1016/j.jconrel.2013.09.019
- Harsha S. 2013. Pharmaceutical suspension containing both immediate/sustained-release amoxicillin-loaded gelatin nanoparticles: preparation and in vitro characterization. *Drug Design Development and Therapy* 7: 1027-1033. Doi: 10.2147/DDDT.S39956
- Hasaneen MNA, Abdel-Aziz HMM, El-Bialy DMA, Omer AM. 2014. Preparation of chitosan nanoparticles for loading with NPK fertilizer. *African Journal of Biotechnology* 13(31): 3158-3164. Doi:10.5897/AJB2014.13699
- Hayashi T, Mukamel S. 2008. Two-dimensional vibrational lineshapes of amide III, II, I and A bands in a helical peptide. *Journal of Molecular Liquids* 141: 149-154.

- Hecht H, Srebnik S. 2016. Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. *Biomacromolecules* 17(6): 2160-2167. Doi: 10.1021/acs.biomac.6b00378
- 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.
- Leo E, Vandelli MA, Cameroni R, Forni F. 1997. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. *International Journal of Pharmaceutics* 155(1): 75-82.
- Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleteix F, Vandamme TF. 2010. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release* 147(2): 304-310. Doi: 10.1016/j.jconrel.2010.07.113
- Morrissey S. 2006. Nanotechnology in food and agriculture. *Chemical and Engineering News* 84(16): 31-31.
- Naderi MR, Danesh-Shahraki A. 2013. Nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5(19): 2229-2232.
- Rai V, Acharya S, Dey N. 2012. Implications of nanobiosensors in agriculture. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 3: 315-324. Doi: 10.4236/jbnb.2012.322039
- Srilatha B. 2011. Nanotechnology in agriculture. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* 2(7): 1-5. Doi: 10.4172/2157-7439.1000123
- Subbarao CV, Kartheek G, Sirisha D. 2013. Slow release of potash fertilizer through polymer coating. *International Journal of Applied Science and Engineering* 11(1): 25-30.
- Tsuji K. 2001. Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. *Journal of Microencapsulation* 18(2): 137-147. Doi: 10.1080/026520401750063856

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. Doi: 10.1166/jnn.2012.5801

CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE UN NANOFERTILIZANTE FOSFATADO EN EL CRECIMIENTO, ESTADO NUTRIMENTAL Y FOTOSÍNTESIS DE PLANTAS DE ARROZ

2.1. INTRODUCCIÓN

El uso de la nanotecnología en la agricultura implica la liberación controlada de algunas sustancias, principalmente productos fitosanitarios y fertilizantes. Es de suma importancia, tener en cuenta que la eficiencia de absorción y utilización, así como los efectos de nanopartículas en el crecimiento y las funciones metabólicas varían entre especies en plantas superiores ([Nair et al., 2010](#)).

En alfalfa (*Medicago sativa*), maíz (*Zea mays*), pepino (*Cucumis sativus*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), la aplicación de nanopartículas de cerio (Ce) a concentraciones de 500, 1000, 2000 y 4000 mg L⁻¹, promovieron el crecimiento de plántulas en cajas Petri ([López-Moreno et al., 2010](#)).

[González et al. \(2008\)](#) determinaron la penetración y translocación de nanopartículas de Fe revestidas de carbono, en plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*). Las nanopartículas fueron suspendidas en un fluido, el cual fue aplicado en el hueco interno del pecíolo de las hojas, colocaron pequeños imanes al pecíolo de la hoja opuesta y en la raíz. Para la detección y análisis de las nanopartículas dentro de las plantas utilizaron microscopía de luz convencional y microscopía confocal. Mediante las micrografías se demostró la penetración y movimiento de las nanopartículas a través del sistema vascular hasta el lugar donde colocaron los imanes.

En la absorción de nanopartículas por las células vegetales se ha postulado la existencia de varias vías; pueden entrar mediante la unión a proteínas transportadoras, a través de las acuaporinas, por medio de canales iónicos, gracias a la creación de nuevos poros (exclusivo en nanotubos de carbono, los nanotubos crean o forman los poros para entrar a la célula) o mediante endocitosis (Kurepa *et al.*, 2010). En diversas especies vegetales se mostró que nanopartículas recubiertas con carbono, aplicadas tanto en la parte aérea como en la raíz pueden traslocarse a otros tejidos. El transporte en la raíz se produce de una célula a otra vía plasmodesmos (Cifuentes *et al.*, 2010).

Después del trigo, el arroz es el cereal más consumido por el hombre a nivel global y constituye un alimento básico para más del 40% de la población mundial (Tolentino-Martínez, 2014). Para los próximos años se requerirá una producción de 8 a 10 millones de toneladas por año. Sin la expansión de la superficie agrícola, se requerirá un aumento en el rendimiento de 0.6 t ha⁻¹ en promedio a nivel mundial (Seck *et al.*, 2012). Para abastecer esta demanda, es fundamental buscar mayor eficiencia en la absorción y en el uso de fertilizantes primarios, incluyendo el P, y en consecuencia, tener menor dependencia de la cuantiosa aplicación del fertilizante al cultivo y buscar la sostenibilidad en la producción agrícola (Wu *et al.*, 2013). En México, el cultivar Morelos de arroz ha conservado desde su origen características únicas y exclusivas agronómicas, molineras y culinarias, que lo han posicionado como uno de los arroces de mejor calidad tanto a nivel nacional e internacional (Tolentino-Martínez, 2014).

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de un nanofertilizante fosfatado en el crecimiento, parámetros fisiológicos y nutrimentales de plantas de arroz durante etapa vegetativa; lo anterior, en ausencia de otros nutrimentos constituyentes de una solución nutritiva, para evitar interacciones. Este objetivo se basó en la hipótesis de que el comportamiento del nanofertilizante fosforado es dependiente de las características y propiedades del medio al que es suministrado. Se usó como referencia la concentración de P de la solución nutritiva Yoshida ($0.383 \text{ mol}_{(+)} \text{ m}^{-3}$), la cual fue generada en particular para el arroz ([Yoshida et al., 1976](#)).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Ubicación del experimento y material vegetal

El experimento se instaló en un invernadero tipo cenital ubicado en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Se usaron semillas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) cultivar Morelos A-2010 ([Salcedo-Aceves y Barrios-Gómez, 2012](#)). Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% durante 5 min e hipoclorito de sodio al 3% durante 30 min. Posteriormente las semillas fueron enjuagadas con agua destilada y se dejaron secar en papel absorbente. Una vez secas, se germinaron en medio MS ([Murashige y Skoog, 1962](#)), suplementado con sacarosa (3%) y agar (0.8%).

2.2.2. Establecimiento del experimento

Doce días después de la siembra, las plántulas fueron trasplantadas en recipientes de 5 L con solución nutritiva Yoshida (Yoshida *et al.*, 1976) al 50% de su concentración (0.715 mM NH_4NO_3 , 0.500 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.820 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.660 K_2SO_4 , 0.192 mM NaH_2PO_4 , 3.995 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.075 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.038 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.695 μM H_3BO_3 , 1 mM Fe-EDTA). En la preparación de la solución nutritiva se utilizó agua destilada y reactivos grado analítico de la marca JT Baker (Phillipsburg, NJ, EEUU); para Fe-EDTA Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). En cada recipiente se establecieron 8 plántulas. El pH de la solución nutritiva fue ajustado entre 5.5 y 6.0 y ésta fue renovada cada siete días. En estas condiciones las plántulas permanecieron durante 30 días en un periodo de aclimatación. Posterior al periodo de aclimatación en hidroponía antes indicado, las plantas permanecieron durante siete días en la solución nutritiva Yoshida al 50% desprovista de P.

2.2.3. Tratamientos evaluados

Los tratamientos evaluados (**Cuadro 2.1**) iniciaron después de un periodo de siete días de privación de P (37 días después del trasplante), con plantas de arroz con una altura promedio de 32.5 cm. Los tratamientos 1 y 2 son testigos negativos; es decir, no contienen P. El tratamiento 2 consistió en la adición de gelatina tipo A (obtenida por hidrólisis ácida), polímero utilizado para la síntesis de las nanopartículas evaluadas en los tratamientos 5 a 8. Los tratamientos 3 y 4 contenían 50 y 100% de la concentración de P descrita en la solución Yoshida (0.1915 y 0.3830 $\text{mol}_{(+)} \text{m}^{-3}$, respectivamente), empleando KH_2PO_4 (JT Baker) como fuente de P. Los tratamientos 5 y 6 contenían también el 50 y 100% de la

concentración de P de la solución Yoshida, solo que la fuente de P fue el nano-KH₂PO₄ cubierto con gelatina tipo A, cuya síntesis se describió en el Capítulo 2 de esta tesis. Finalmente, los tratamientos 7 y 8 consistieron en el suministro de P a partir del nano-KH₂PO₄ cubierto con gelatina tipo A al 50 y 100%, respectivamente de la concentración de P indicada en la solución Yoshida, pero con la adición de la enzima tripsina (EC 3.4.21.4; enzima proteolítica que cataliza la rotura hidrolítica de los enlaces peptídicos establecidos entre Arg y Lis), a concentraciones de 0.1 y 0.2 mg L⁻¹, respectivamente.

Cuadro 2.1. Tratamientos evaluados en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010.

Tratamiento	Descripción
1	Agua destilada
2	Polímero [§] (0.1042 g L ⁻¹)
3	50% [¥] P a partir de KH ₂ PO ₄ (0.0260 g L ⁻¹)
4	100% [¥] P a partir de KH ₂ PO ₄ (0.0521 g L ⁻¹)
5	50% [¥] P a partir de nano-KH ₂ PO ₄ (0.0781 g L ⁻¹)
6	100% [¥] P a partir de Nano-KH ₂ PO ₄ (0.1563 g L ⁻¹)
7	50% [¥] P a partir de nano-KH ₂ PO ₄ con tripsina (0.1 mg L ⁻¹)
8	100% [¥] P a partir de nano-KH ₂ PO ₄ con tripsina (0.2 mg L ⁻¹)

[§]Polímero: nanopartículas de gelatina tipo A; [¥]Porcentaje de la concentración de P de la solución nutritiva Yoshida; Concentración de P en la solución nutritiva Yoshida al 100%=0.383 mol₍₊₎ m⁻³.

Las soluciones tuvieron un pH de 5.5, y ésta fue renovada a los 7 días. El periodo de tratamientos fue de 14 días. La unidad experimental fue una planta de arroz, y cada tratamiento tuvo 16 repeticiones.

2.2.4. Variables evaluadas

Concentración de P en las soluciones nutritivas. Con el objetivo de evaluar el abatimiento de P en las soluciones nutritivas, se colectaron muestras de éstas antes de ser utilizadas (día 8 de la fase de tratamientos) y después del periodo establecido para la renovación de las mismas (día 14 de la fase de tratamientos). Inmediatamente después de la colecta de las muestras éstas fueron filtradas con papel filtro de poro medio y posteriormente se acidificaron con HNO₃ concentrado, adicionando 5 µL HNO₃ mL⁻¹ de muestra. La determinación de la concentración de P se realizó por espectrometría de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES 725-ES Agilent®; Mulgrave, Australia).

Altura de planta, número de hojas y macollos. Se determinó la altura de planta considerando desde la base hasta la punta de la hoja de mayor longitud. Asimismo se contabilizó el número de hojas y número de macollos. Estas evaluaciones se realizaron a los 0, 7 y 14 días después del inicio de los tratamientos.

Variables relacionadas con fotosíntesis. Se midió la tasa instantánea de fotosíntesis neta, conductancia estomática, concentración intercelular de CO₂ y transpiración en las hojas de arroz, con un equipo portátil IRGA (LI-6400®, LICOR Inc.; Lincoln, NE, EEUU). Las mediciones se hicieron en todos los tratamientos a los 13 días después del inicio de los tratamientos de 13:00 a 14:30 h.

Biomasa seca. Catorce días después del inicio de los tratamientos, las plantas fueron divididas en vástago y raíz para secarlas en una estufa de circulación de aire forzado a 70 °C (HCF-125, Riossa; Monterrey, Nuevo León, México) durante 48 h. Posteriormente, se evaluó el peso de la biomasa seca con una balanza analítica (Adventurer Pro AV213C, OHAUS; Parsippany, NJ, EEUU).

Concentración nutrimental. La concentración nutrimental se estimó en tejido seco de vástago y raíz. La concentración de N se determinó en el extracto de la digestión húmeda (3.3% $C_7H_6O_3$ en H_2SO_4 , 380 °C, 2 h), mediante el método semi-micro-Kjeldahl. La determinación de la concentración de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn y B se realizó en los extractos resultantes de la digestión del material vegetal seco ($HNO_3:HClO_4$, 2:1, v:v, 180 °C, 21 h), usando un equipo de espectrometría de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES 725-ES Agilent).

Contenidos nutrimentales. En vástago y en raíces se determinó el contenido de nutrientes considerando la concentración de cada nutriente y el peso de la biomasa seca determinada en cada uno de los órganos.

2.2.5. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS ver. 9.4 (SAS, 2016), bajo un diseño experimental completamente al azar. El análisis de varianza y comparación de medias se realizó con la prueba LSD con un nivel de significancia de 95%.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Disminución de P en las soluciones nutritivas

En la **Figura 2.1** se muestran las concentraciones de P en las soluciones nutritivas iniciales y después de 7 d de suministrarlas a las plantas de arroz (del día 8 al 14 de tratamientos).

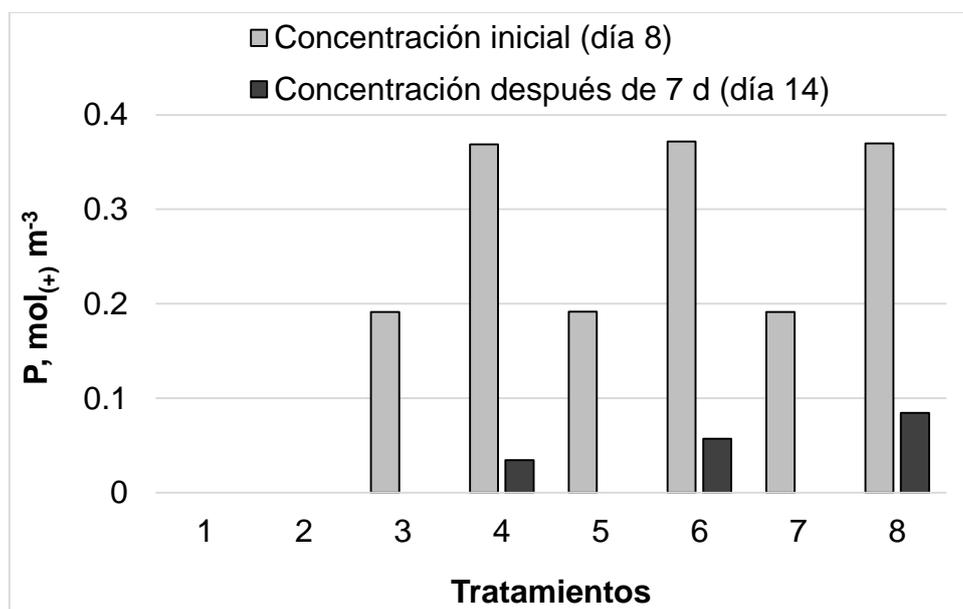


Figura 2.1. Concentración de P en la solución inicial (día 8 del inicio de tratamientos) y su disminución después de 7 d en presencia de plantas de arroz (día 14 del inicio de tratamientos).

Medias de tres repeticiones independientes. Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A (0.1042 g L^{-1}); 3=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

Después de 7 d, en las soluciones nutritivas con el 50% de P de la solución de Yoshida (tratamientos 3, 5 y 7), independientemente de la fuente de P empleada, se observa que la totalidad del P había sido absorbido por las plantas. Por el contrario, después de 7 d, las soluciones con el 100% de la concentración de P

de la solución nutritiva Yoshida, presentaban aun disponibilidad de este elemento; esta disponibilidad después de 7 d fue del 9.34, 15.37 y 22.84% de la concentración inicial, cuando las fuentes de P fueron KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con enzima, respectivamente.

Estos resultados confirman que se tenían dos condiciones de suficiencia de P en las soluciones nutritivas después de 7 días de incubación con las plantas de arroz. Asimismo, es posible observar aparentes efectos diferenciales en la absorción de P en función de la fuente de este elemento, el nanofertilizante con la adición de tripsina tuvo una concentración más alta después de 7 días que el resto de fuentes; y por tanto, presumiblemente se absorbió en menor cantidad. *A priori*, lo anterior podría interpretarse como una menor eficiencia de absorción de P a partir de los nanofertilizantes (eficiencia de absorción del KH_2PO_4 fue de 90.6%; la del nano- KH_2PO_4 de 84.63% y la del nano- KH_2PO_4 con tripsina es de 77.16%), entendido como eficiencia de absorción de P a la capacidad de la raíz para absorber P desde el medio de crecimiento ([Gemenet et al., 2015](#)).

2.3.2. Altura de planta

Después de 7 d la altura de planta se incrementó 1.6 y 1.3 % con agua destilada y el polímero, respectivamente. Cuando se agregó una concentración de P al 50% a partir del KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con enzima, la altura se incrementó en 2.85, 2.73 y 2.31%, respectivamente. Las mismas fuentes con 100% de P de la solución Yoshida, mostraron un crecimiento ligeramente menor, con incrementos de 2.61, 2.50 y 2.29%, respectivamente (**Figura 2.2**).

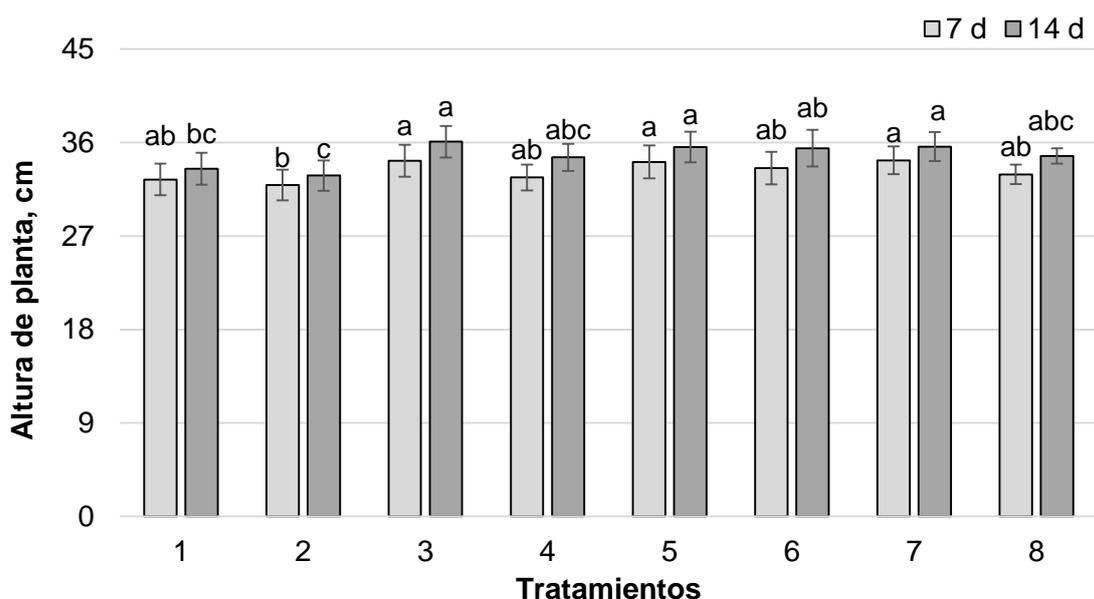


Figura 2.2. Altura de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha de muestreo son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=8$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH₂PO₄; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH₂PO₄; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano-KH₂PO₄; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano-KH₂PO₄; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano-KH₂PO₄ con tripsina (0.1 mg L⁻¹); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano-KH₂PO₄ con tripsina (0.2 mg L⁻¹).

En el muestreo realizado a los 14 d de tratamiento se registraron incrementos acumulados en crecimiento de 4.81 y 4.14% con agua destilada y el polímero, respectivamente. Las concentraciones de 50% de P, suministradas a partir de KH₂PO₄, nano-KH₂PO₄ y nano-KH₂PO₄ con enzima, ocasionaron incrementos en la altura de 8.33, 7.03 y 6.28%, respectivamente. Los incrementos en altura al suministrar 100% de P en la solución Yoshida fueron ligeramente superiores, independientemente de la fuente de P, en comparación con la adición de 50% del P, con valores de 8.66, 8.37 y 7.82% para KH₂PO₄, nano-KH₂PO₄ y nano-KH₂PO₄ con enzima, respectivamente (**Figura 2.2**).

Si bien no existieron diferencias estadísticas significativas en la altura de planta entre los tratamientos conteniendo P (tratamientos 3 a 8) en ambos muestreos, los resultados indican que los incrementos porcentuales en altura fueron, en todos los casos superiores, cuando el P se suministró a partir de KH_2PO_4 . **(Figura 2.2).**

En esta investigación las distintas fuentes de abastecimiento de P, e incluso las concentraciones de éste, no afectaron, de manera significativa la altura de la planta en arroz. En contraste a los resultados aquí obtenidos, [Liu y Lal \(2014\)](#) sintetizaron nanopartículas (NPs) de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) de aproximadamente 16 nm de tamaño y evaluaron su efecto *Glycine max* en sustrato (50% de perlita y 50% turba) en invernadero. Los datos mostraron que la aplicación de nanopartículas incrementó la tasa de crecimiento y el rendimiento de semillas *G. max* en 33 y 20%, respectivamente, en comparación con aquellas plantas tratadas con un fertilizante fosforado regular [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$]. Los datos indicaron que las raíces de *G. max* absorben nanopartículas de hidroxiapatita como una fuente de P eficaz y mantienen el crecimiento saludable y un rendimiento elevado.

2.3.3. Número de hojas

Después de 7 y 14 d después del inicio de tratamientos, el incremento en el número de hojas fue influenciado por la concentración de P en las soluciones nutritivas, con una relación positiva entre el número de hojas y la concentración de P **(Figura 2.3).**

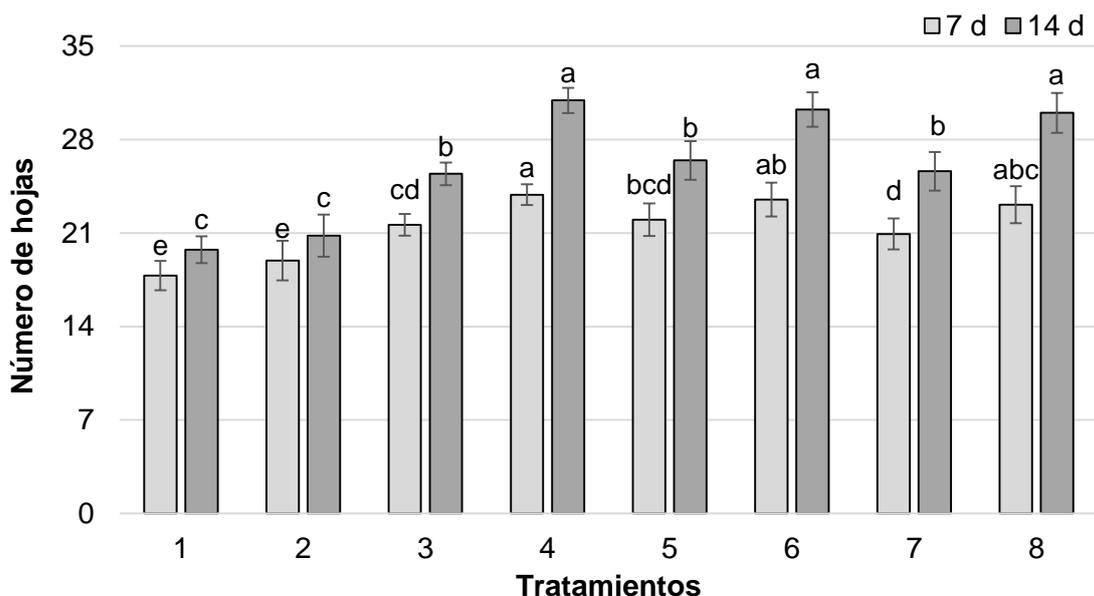


Figura 2.3. Número de hojas en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha de muestreo son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=8$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

Después de 7 d de tratamiento, las plantas tratadas con agua destilada y polímero tuvieron 2 y 2.3 más hojas, respectivamente. Los tratamientos con 50% de la concentración de P a partir de KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con tripsina, incrementaron 4.3, 4.7 y 4.0 hojas, respectivamente; mientras que el tratamiento con la concentración de 100% a partir de KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con tripsina se presentaron 6.8, 6.6 y 6.8 más hojas (**Figura 2.3**).

Las plantas de arroz tratadas con agua destilada y polímero incrementaron su número de hojas en 3.9 y 4.1, respectivamente, después 14 d de tratamiento. El tratamiento con concentraciones de P del 50% de la solución Yoshida suministradas a partir de KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con enzima a incrementaron en 8.1, 9.1 y 8.7, respectivamente, el número de hojas; mientras

que con las mismas fuentes de P pero al 100% de la concentración, se mostraron aumentos en el número de hojas de 13.9, 13.3 y 13.7, respectivamente (**Figura 2.3**).

Como se indicó previamente, el número de hojas en las plantas de arroz, incrementó conforme aumentó la concentración de P en las soluciones nutritivas (**Figura 2.3**). En otras gramíneas como maíz y el pasto *Lolium perenne*, la deficiencia de P reduce la tasa de división y expansión celular, pero no afecta los controles generales de la morfogénesis celular ([Assuero et al., 2004](#); [Kavanová et al., 2006](#)). Sin embargo, plantas incluso del mismo género pueden diferir en la tolerancia a los efectos del estrés causado por deficiencia de P en el crecimiento de la hoja, y esta diferencia es debida principalmente a la capacidad para mantener la división celular, la expansión de las células epidermales de la hoja o ambas ([Kavanová et al., 2006](#)). En esta investigación las plantas tratadas con 50% del P de la solución Yoshida, tenían tres semanas (21 días) bajo condición de estrés por deficiencia de P, considerando los siete días en que no se suministró este elemento, periodo previo al inicio de aplicación de tratamientos; por lo tanto, es explicable la reducción en el número de hojas observada en el primer muestreo. En este sentido, plántulas de soya privadas de P durante 32 días después de la germinación, mostraron tasas decrecientes de iniciación foliar después de dos semanas, a pesar de que el ápice fue similar en tamaño y en número de células al de plantas control ([Chiera et al., 2002](#)).

En particular, [Dobermann y Fairhurst \(2000\)](#), indican que plantas de arroz de color verde oscuro con hojas erectas y macollo reducido pueden indicar

deficiencia de P. Asimismo, estas plantas presentan tallos delgados y desarrollo retardado. También puede reducirse el número de hojas, panículas y granos por panícula. Las hojas jóvenes parecen estar sanas, pero las hojas más viejas se vuelven marrones y mueren. Los colores rojo y morado pueden desarrollarse en hojas si la variedad tiene una tendencia a producir antocianina. El abatimiento observado en la concentración de P en las soluciones con el 50% de P de la solución Yoshida (**Figura 2.1.**), apoyan las afirmaciones acerca de la deficiencia de P.

2.3.4. Número de macollos

En la **Figura 2.4** se presenta el número de macollos que tuvieron las plantas de arroz después de 7 y 14 d de tratamiento. Se observan efectos significativos atribuibles tanto a la concentración de P de la solución nutritiva como a la fuente de P empleada (**Figura 2.4**).

Dado que el número de macollos fue diferente entre plantas incluso del mismo tratamiento, se considera pertinente describir los incrementos en número que se tuvieron en esta variable. Después de 7 d del inicio de tratamientos, el número de macollos aumentó 1.1 y 1.9 en plantas de los tratamientos con agua destilada y polímero, respectivamente. Plantas de los tratamientos con el 50% de la concentración de P de la solución Yoshida a partir del KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con tripsina tuvieron un aumento en el número de macollos de 2.8, 2.4 y 3.9, respectivamente, después de 7 d de tratamiento. En la concentración de P al 100% de la solución Yoshida, suministrado con las fuentes antes

referidas se registraron incrementos en el número de macollos de 3.9, 4.1 y 4.2, respectivamente (**Figura 2.4**).

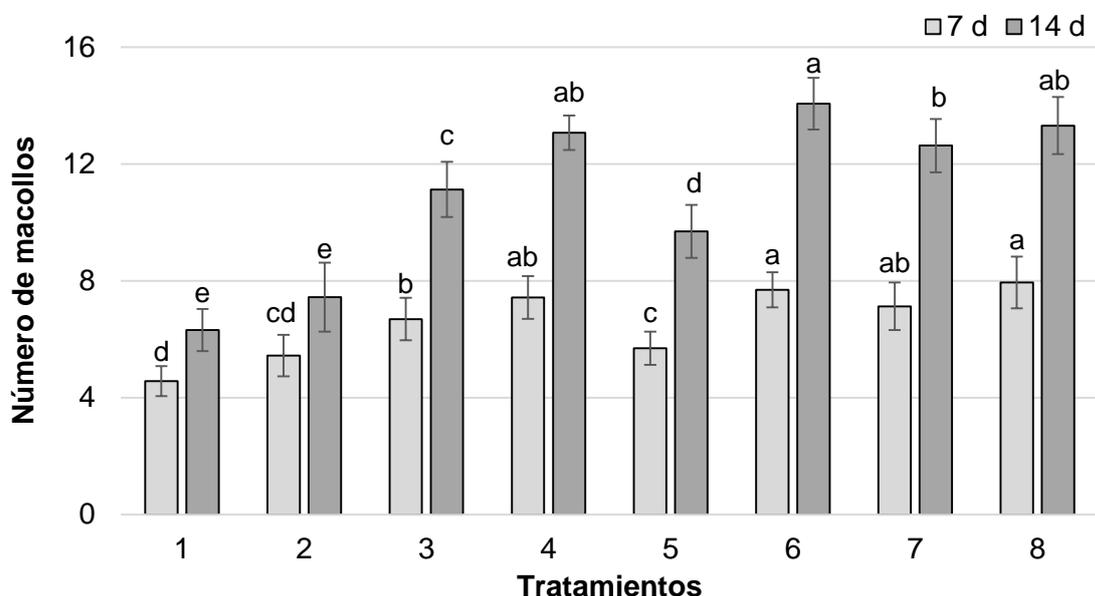


Figura 2.4. Número de macollos en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada fecha de muestreo son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=8$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

A los 14 d, en los tratamientos de agua destilada y polímero el número de macollos aumentó en 2.8 y 3.9, respectivamente. El suministro de P a 50% de la concentración de P de la solución Yoshida a partir del KH_2PO_4 , nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con tripsina, aumentó 7.2, 6.4 y 9.4 macollos por planta. Por otra parte, en la concentración de P al 100% con las mismas fuentes incrementaron 7.2, 10.5 y 9.6 el número de macollos, respectivamente. En plantas tratadas con nano- KH_2PO_4 se observa solo un incremento importante en el número de macollos al pasar de 50 a 100% la concentración de P en el medio (**Figura 2.4**).

En general existe relación positiva entre el número de macollos y la concentración de P inicial en las soluciones nutritivas (**Figura 2.4**). El P es particularmente importante en etapa temprana del crecimiento. Este es móvil dentro de la planta y promueve el desarrollo de las raíces, el amacollamiento, la floración temprana y la maduración (especialmente cuando la temperatura es baja). La planta removiliza el P a dentro de la planta durante etapas de crecimiento posteriores si este elemento se ha absorbido en cantidades suficientes durante el crecimiento temprano ([Dobermann y Fairhurst, 2000](#)). De hecho, un buen suministro de P induce mayor amacollamiento en plantas de arroz ([Chaudhary y Nanda, 2003](#)).

2.3.5. Biomasa seca

El peso de la biomasa seca del vástago no se obtuvo diferencia estadística significativa entre plantas tratadas con agua destilada, el polímero y tampoco entre plantas de los tratamientos conteniendo P (**Figura 2.5**).

Si bien el periodo de tratamiento en las plantas de arroz fue corto (14 d) y pueda, por tanto, atribuirse a éste el no observar diferencias estadísticas significativas en la acumulación de biomasa en vástagos; es importante considerar que, en soya, la expresión constitutiva del gen *OsPT6* (que codifica para el transportador *OsPT6* de alta afinidad en arroz) inducida por el promotor 35S, mejoró el crecimiento bajo condiciones de bajo suministro de P en cultivo hidropónico ([Yan et al., 2014](#)). Lo anterior pudo haber ocurrido en este estudio, no solo en los tratamientos testigos, sino también en aquellos con suministro bajo de P.

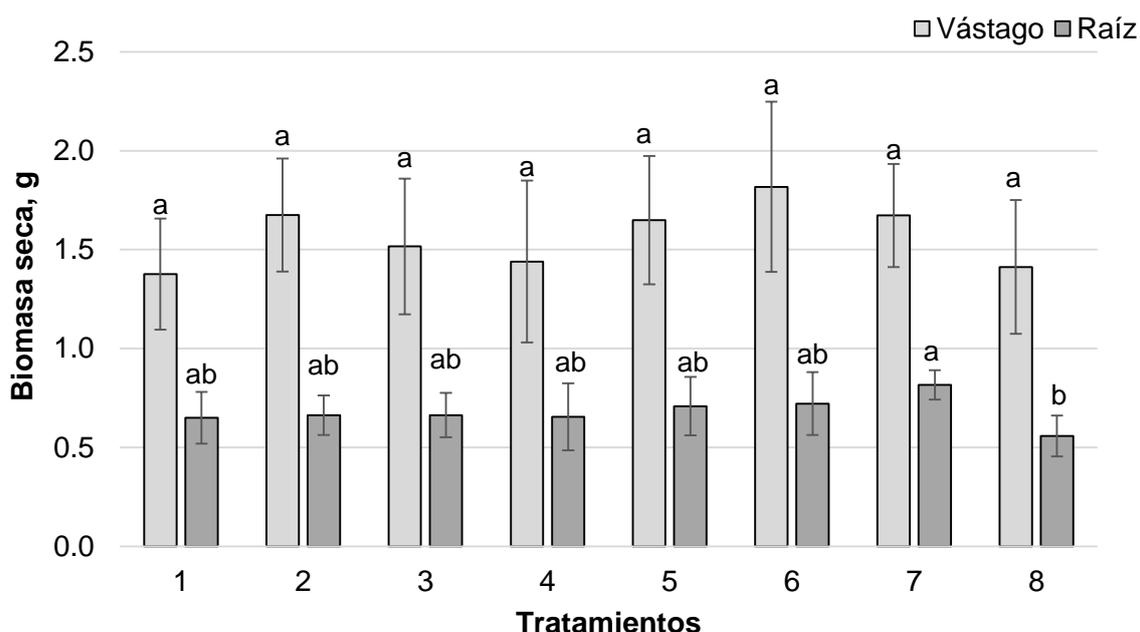


Figura 2.5. Peso de biomasa seca de vástago y de raíz de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada órgano son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=8$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

La biomasa seca de raíz se obtuvo diferencia estadística significativa entre dos de los tratamientos evaluados; es decir, entra la media más alta (0.8164 g), registrada ésta en plantas donde la fuente de P fue nano- KH_2PO_4 con la enzima tripsina y con el 50% de la concentración de P de la solución Yoshida, y el tratamiento de nano- KH_2PO_4 al 100% de la concentración de P con enzima, el cual presentó el menor peso de biomasa seca en raíz (0.5579 g) (**Figura 2.5**).

Si bien no existen diferencias estadísticas significativas en la biomasa seca de raíz entre el resto de los tratamientos, como se indicó previamente, es importante notar que el tratamiento con el 100% de la concentración de P de la solución

Yoshida a partir del nano-KH₂PO₄ con enzima (tratamiento 8), presentó menor biomasa seca de raíces que el resto de los tratamientos. Por ejemplo, la biomasa seca de raíz de este tratamiento, representa solo el 85% de la biomasa seca de raíces promedio los tratamientos 1 y 2 (testigos sin P).

En plántulas de arroz Nipponbare bajo deficiencia de P, [Luquet et al. \(2005\)](#) confirmaron que el efecto principal de la deficiencia de P es una reducción del crecimiento de los brotes para el beneficio del sistema radicular. La reducción del crecimiento de los brotes se asoció con una reducción de la tasa de elongación de la hoja, mientras que el tamaño final de la hoja permaneció sin cambios. En el contexto anterior, es posible inferir que en el tratamiento con nano-KH₂PO₄ al 100% de la concentración de P con enzima se observaron en menor medida cambios morfológicos en la raíz ocasionados por la deficiencia de P que han sido documentados en arroz ([Li et al., 2009](#)).

No se observó efecto estadístico significativo en biomasa seca total y relación de biomasa seca vástago/raíz en plantas de arroz tratadas con las diferentes fuentes y concentraciones de P, así como en las tratadas con agua destilada y polímero; sin embargo, se observa que en el tratamiento 8 (100% de la concentración de P a partir de nano-KH₂PO₄ con enzima), es donde se presenta el menor valor de biomasa seca total (**Cuadro 2.2**). En numerosas investigaciones se ha reportado que las deficiencias de macronutrientes esenciales, entre ellos el P, producen una acumulación de carbohidratos en las hojas y las raíces, y modifican la relación de la biomasa seca entre vástago y raíz ([Hermans et al., 2006](#)); en este contexto, el menor peso de biomasa seca

total del tratamiento 8 podría deberse a una menor acumulación de carbohidratos, lo que se interpretaría como un indicador de estatus de suficiencia de P. Por otro lado, probablemente el corto periodo de tratamientos es la causa de no observar diferencias importantes en la relación de pesos de biomasa seca de vástago y raíz.

Cuadro 2.2. Biomasa seca total y relación de biomasa seca vástago/raíz de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010 tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Tratamiento	Biomasa seca total, g	Relación de biomasa seca vástago/raíz
1	2.025 ± 0.321 a	2.293 ± 0.416 a
2	2.338 ± 0.378 a	2.521 ± 0.193 a
3	2.179 ± 0.453 a	2.178 ± 0.253 a
4	2.094 ± 0.434 a	2.623 ± 0.816 a
5	2.358 ± 0.471 a	2.351 ± 0.098 a
6	2.539 ± 0.586 a	2.483 ± 0.135 a
7	2.489 ± 0.279 a	2.090 ± 0.335 a
8	1.970 ± 0.441 a	2.474 ± 0.124 a

Medias ± DE con letra distinta en cada columna son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; n=8). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L⁻¹); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L⁻¹).

2.3.6. Concentración de macronutrientes en vástagos

Los tratamientos tuvieron efecto estadístico significativo en la concentración de macronutrientes en vástago de plantas de arroz. En el caso de N, el tratamiento nano- KH_2PO_4 al 100% de concentración de P con enzima, presenta mayor concentración de este elemento (24.325 g kg⁻¹) y las menores concentraciones

se presentan en los tratamientos KH_2PO_4 100% y nano- KH_2PO_4 50% (19.075 g kg^{-1}) (**Figura 2.6A**).

Al adicionar las diferentes fuentes de P a las plantas de arroz, la mayor concentración de P se presentó en los tratamientos con 100% de P de la concentración Yoshida, independientemente de la fuente empleada; KH_2PO_4 (4.9141 g kg^{-1}), nano- KH_2PO_4 (4.4617 g kg^{-1}) y nano- KH_2PO_4 con enzima (4.6362 g kg^{-1}). Por otra parte, menores concentraciones de P se presentaron en los tratamientos con 50% de P, suministrado a partir de KH_2PO_4 (3.6691 g kg^{-1}), nano- KH_2PO_4 (3.4891 g kg^{-1}) y nano- KH_2PO_4 con enzima (3.5871 g kg^{-1}). Asimismo, es evidente que la menor concentración de P se encontró en los tratamientos testigo agua destilada (1.3405 g kg^{-1}) y polímero (1.2757 g kg^{-1}) (**Figura 2.6B**).

Respecto a la concentración de K los valores mayores los presentan las plantas tratadas con nano- KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con enzima, en ambos casos con la concentración de P al 100%. El menor valor lo presenta el tratamiento de polímero (15.704 g kg^{-1}) (**Figura 2.6C**). Las concentraciones de Ca no muestran una tendencia atribuible a los tratamientos evaluados (**Figuras 2.6D**). De manera general, las concentraciones de Mg en los tratamientos con P, fueron incrementadas cuando se utilizó como fuente de P al KH_2PO_4 , tanto al 50 como al 100% de la concentración de la solución Yoshida (**Figura 2.6E**); asimismo esta tendencia fue observada en el tratamiento 1 (agua destilada). Finalmente, en la concentración de S no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos con P; y los valores registrados en los tratamientos testigo son estadísticamente superiores a los valores de concentración de S registrados en

el vástago del resto de los tratamientos (**Figura 2.6F**). Dadas sus funciones vitales en el sostenimiento del crecimiento y su participación en vías metabólicas relacionadas en plantas, el azufre y el fósforo, han desarrollado mecanismos coordinados y estrechamente controlados para mantener la homeostasis intracelular ([Rouached et al., 2011](#)). Las similitudes en la topología de los transportadores de sulfato (SO_4^{2-}) y fosfato (P_i) dan lugar a una conversación cruzada entre las vías de respuesta de SO_4^{2-} y P_i . El factor de transcripción PHR1 parece desempeñar un papel importante; dos genes están implicados en la sustitución de fosfolípidos por sulfolípidos en plantas deficientes en P_i , SQD1 y SQD2, contienen un sitio de unión a PHR1 en su promotor y son regulados por la deficiencia de P_i , del mismo modo a deficiencia de SO_4^{2-} hay una sustitución de sulfolípidos por fosfolípidos ([Rouached, 2011](#)).

Como se dijo en la metodología, antes de aplicar los tratamientos, las plantas de arroz fueron desprovistas de P durante 7 días; asimismo, previamente se indicó que en la **Figura 2.6F** se muestra claramente que una vez que se suministra P (tratamientos 3 a 8), la concentración de S resultó inferior a los tratamientos sin contenido de P. Por lo que es posible que durante ese periodo las plantas pudieron haber realizado mayor absorción de S para sustituir las funciones antes descritas al tener ausencia de P.

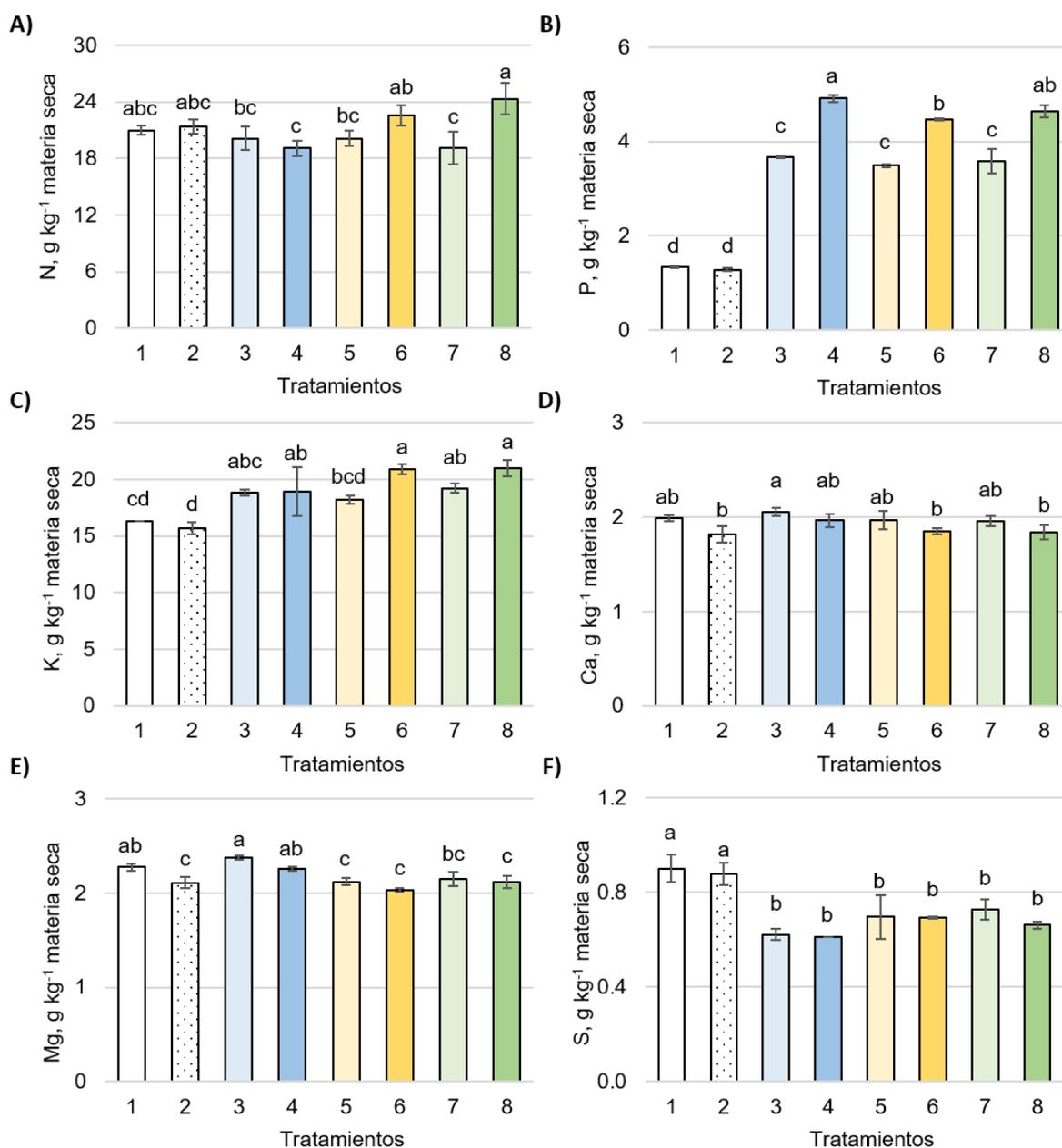


Figura 2.6. Concentración de macronutrientos en vástagos de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=4$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

La concentración de P en vástago (**Figura 2.6**) en los tratamientos con suministro del 100% de P en la solución Yoshida, se asocia de manera positiva con la disminución de P en la solución (**Figura 2.1**); es decir, se tiene mayor concentración en vástagos donde la disminución de P es mayor; en este caso en la solución donde el P fue suministrado a partir de KH_2PO_4 (**Figura 2.6B**).

Por otra parte, si bien la mayoría de las investigaciones sobre aplicación de nanopartículas en plantas se han realizado con nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, tales como TiO_2 , Ag^0 , CuO , CeO_2 , Fe_3O_4 y ZnO ([Ma et al., 2015](#)), en el presente estudio se demuestra absorción y transporte de nanopartículas de P dados los resultados de concentración de este elemento en vástagos (**Figura 2.6B**). De manera similar, en maíz, [Wang et al. \(2012\)](#) demostraron absorción, translocación y distribución de nanopartículas de CuO ($n\text{CuO}$) (20-40 nm) en raíz, su transporte a través del xilema y su retorno a la raíz a través del floema.

2.3.7. Acumulación de macronutrientes en vástagos

La acumulación de macronutrientes en vástago de plantas de arroz muestra diferencias estadísticas significativas. El tratamiento con nano- KH_2PO_4 100% de la concentración de P en la solución Yoshida, evidencia mayor contenido de N (41.041 mg), P (8.1114 mg), K (37.978 mg), Ca (3.3688 mg) y Mg (3.6917 mg) (**Figuras 2.7A a 2.7E**); y la acumulación de N, P y K, superiores a los registrados en el resto de los tratamientos (**Figuras 2.7A, B y C**).

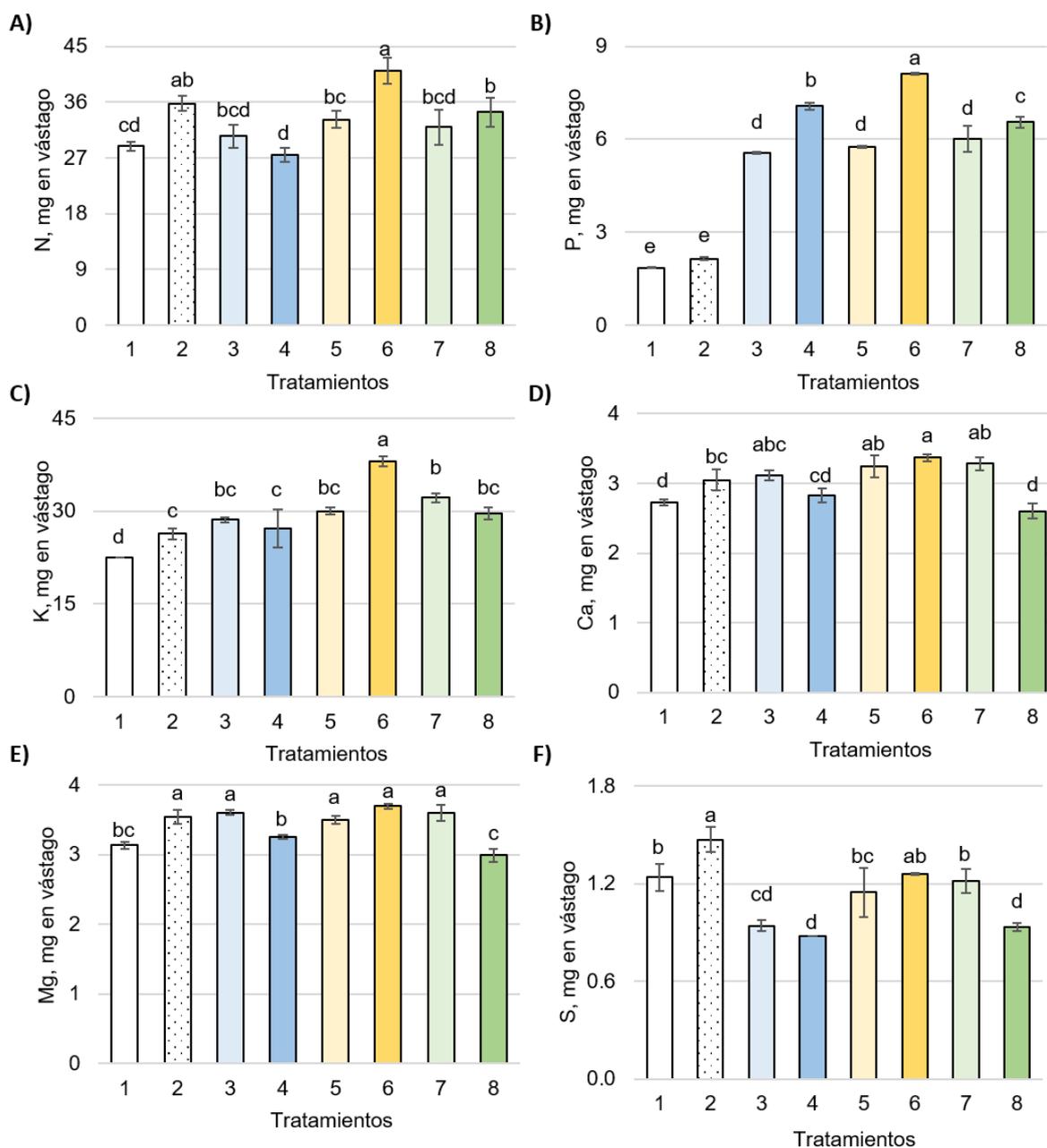


Figura 2.7. Acumulación de macronutrientes en vástagos de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada figura son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=4$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

Asimismo, destaca que existen diferencias significativas en la acumulación de P entre los tratamientos en los cuales éste es ofertado al 100% de la concentración de la solución Yoshida; es decir, entre los tratamientos 4, 6 y 8 (**Figura 2.7B**). En este caso, las diferencias encontradas son atribuibles a la fuente de abastecimiento de P, donde el tratamiento con nano-KH₂PO₄ presenta mayor acumulación de P (8.1114 mg), seguido de los tratamientos con KH₂PO₄ y nano-KH₂PO₄ con enzima (7.0763 y 6.5463 mg, respectivamente).

Las interacciones entre nutrimentos son de suma importancia en la formulación balanceada de fertilizantes para cultivos agrícolas. La interacción entre nutrimentos puede ser positiva, negativa o neutra ([Fageria y Oliveira, 2014](#)). Si bien, solo es posible hablar de interacciones cuando un nutrimento afecta la absorción y utilización de otro nutrimento, y en la fase experimental de este estudio no se tuvo presencia de otros nutrimentos en la solución nutritiva; los resultados de acumulaciones de macronutrimentos muestran que la de P se relaciona de manera positivamente con la acumulación del resto de macronutrimentos, en particular en el tratamiento 6 (nano-KH₂PO₄ 100% de la concentración de P en la solución Yoshida) a excepción del S.

Si bien los resultados de la medición de la disminución de P en las soluciones indican menor tasa de absorción de P desde el medio, cuando este elemento se suministró a partir de nanofertilizantes (menor eficiencia de absorción de P; **Figura 2.1**); los resultados de acumulación por el contrario, indican probablemente una mayor eficiencia fisiológica del vástago para el P cuando este elemento es suministrado como nano-KH₂PO₄; respecto al suministro a partir de

KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 con tripsina (**Figura 2.7B**). La eficiencia fisiológica del vástago es un indicador que relaciona la diferencia entre el peso de biomásas secas de vástagos del tratamiento con P y del testigo (tratamiento 1), con la diferencia en contenido de P en vástagos del tratamiento con P y del testigo (tratamiento 1) (Santos *et al.*, 2015).

2.3.8. Concentración de macronutrientos en raíz

En concentración de macronutrientos en raíces de arroz, hubo variaciones estadísticas significativas entre tratamientos (**Figuras 2.8A a 2.8F**).

La mayor concentración de N se observó en raíces del tratamiento nano- KH_2PO_4 100% con enzima (18.375 g kg^{-1}) mientras que en raíces tratadas con KH_2PO_4 a 50% de la solución Yoshida tuvo la menor concentración del elemento (11.9 g kg^{-1}) (**Figura 2.8A**).

Los testigos, agua destilada y el polímero, mostraron la menor concentración de P con valores de 0.94124 y 1.02275 g kg^{-1} , respectivamente. Cuando el P se suministró al 50% de la concentración indicada en la solución Yoshida, no existieron diferencias estadísticas significativas entre las fuentes de P empleadas. Por el contrario, cuando la concentración de P incrementó al 100%, el abastecimiento vía nano- KH_2PO_4 con tripsina, aumentó de manera significativa la concentración de P en las raíces, en comparación con las fuentes KH_2PO_4 y nano- KH_2PO_4 (**Figura 2.8B**).

El tratamiento con 100% del P de la solución Yoshida aplicado a partir de KH_2PO_4 incrementó de manera significativa la concentración de K en raíces (18.2034 g kg^{-1}), en comparación con el resto de los tratamientos. Por el contrario, en los tratamientos consistentes en agua destilada y el polímero se tuvieron las menores concentraciones de K (9.9413 y 10.3284g kg^{-1} , respectivamente) (**Figura 2.8C**).

La mayor concentración de Ca en las raíces se presentó en el tratamiento 7 (100% de P a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina. Por su parte, el tratamiento con KH_2PO_4 al 100% de la concentración de P, presentó la menor concentración de Ca en raíces (**Figura 2.8D**).

En raíces tratadas con el 50% de P indicado en la solución Yoshida a partir de KH_2PO_4 incrementó de manera significativa la concentración de Mg en raíces; por el contrario, en los tratamientos 1 y 6 (agua destilada y 100% de P a partir de nano- KH_2PO_4 , respectivamente, se tuvieron las menores concentraciones de Mg (**Figura 2.8E**).

La concentración de S en raíces fue mayor en los tratamientos testigo (agua y polímero) y en aquellos donde se suministró 50% del P de la solución Yoshida a partir de KH_2PO_4 y de nano- KH_2PO_4 (**Figura 2.8F**).

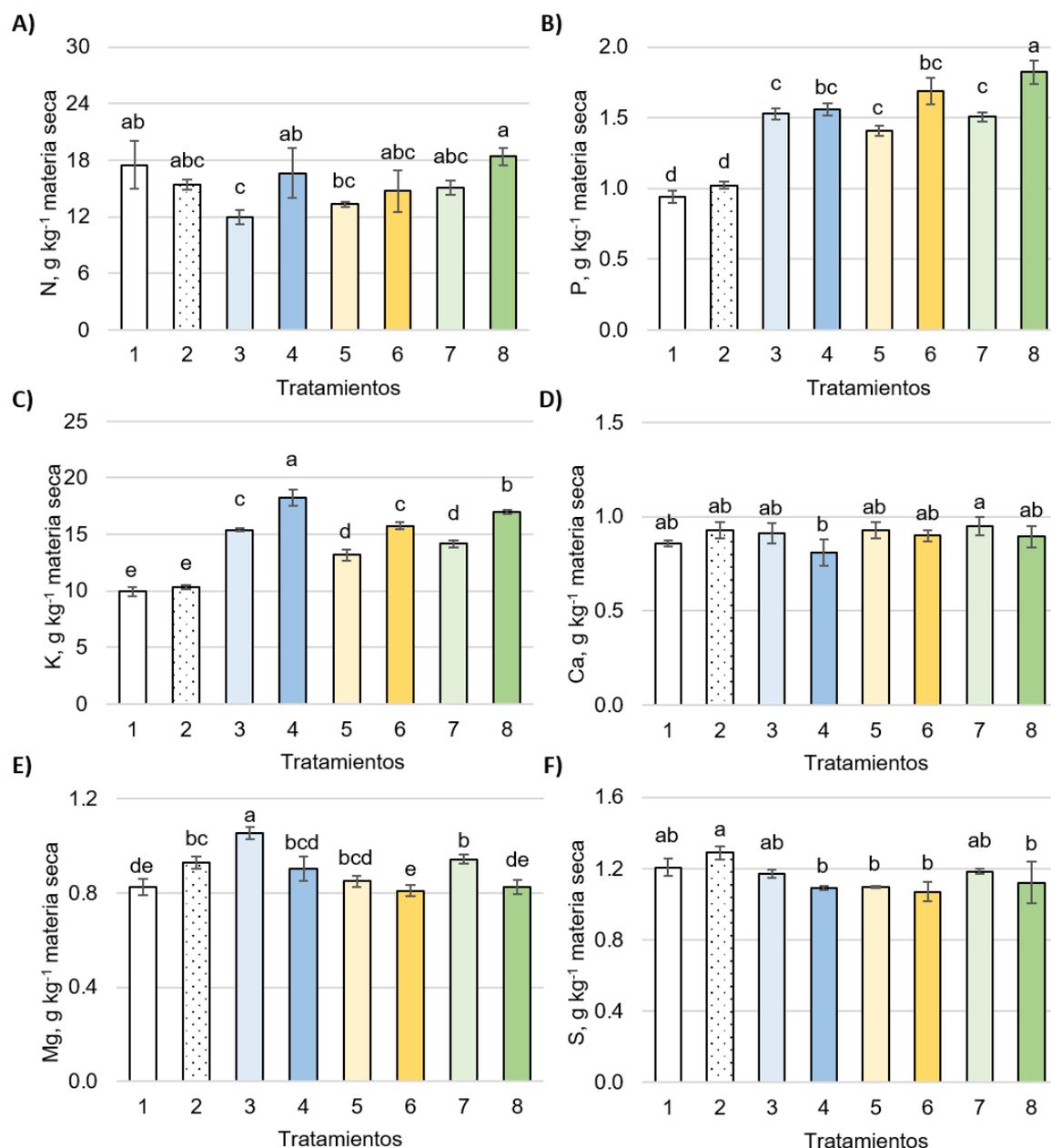


Figura 2.8. Concentración de macronutrientes en raíces de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada figura son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=4$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de [P]_{solución Yoshida} a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

2.3.9. Acumulación de macronutrientes en raíz

Los tratamientos probados tuvieron efectos estadísticos significativos en la acumulación de macronutrientes en raíces de arroz. (**Figura 2.9**).

La acumulación de N en raíces no muestra una tendencia en función de los tratamientos de P aplicados. Los tratamientos agua destilada y nano-KH₂PO₄ al 50% de la concentración de P de la solución Yoshida con la adición de tripsina, incrementaron de manera significativa la concentración de N en raíces, con valores de 11.375 y 12.281 mg, respectivamente. El tratamiento con menor acumulación de N en raíces (7.902 mg de N) fue en donde se aplicó el 50% de la concentración de P de la solución Yoshida empleando como fuente el KH₂PO₄ (**Figura 2.9A**).

Como era esperado, los mayores valores de acumulación de P en raíces se tuvieron en los tratamientos 3 a 8, mismos que contenían P; sin embargo, es importante destacar que solo en el tratamiento donde este elemento fue adicionado a partir de nano-KH₂PO₄ con 50 y 100% de P sin enzima (tratamientos 5 y 6) se tuvo una relación positiva entre la concentración de P ofertada y la acumulación de éste en las raíces (**Figura 2.9B**).

En la acumulación de K en raíces se observa, de manera general una tendencia relacionada en forma directa con la oferta de P en la solución nutritiva; excepto en los tratamientos donde el P fue abastecido a partir de nano-KH₂PO₄ con tripsina (**Figura 2.9C**).

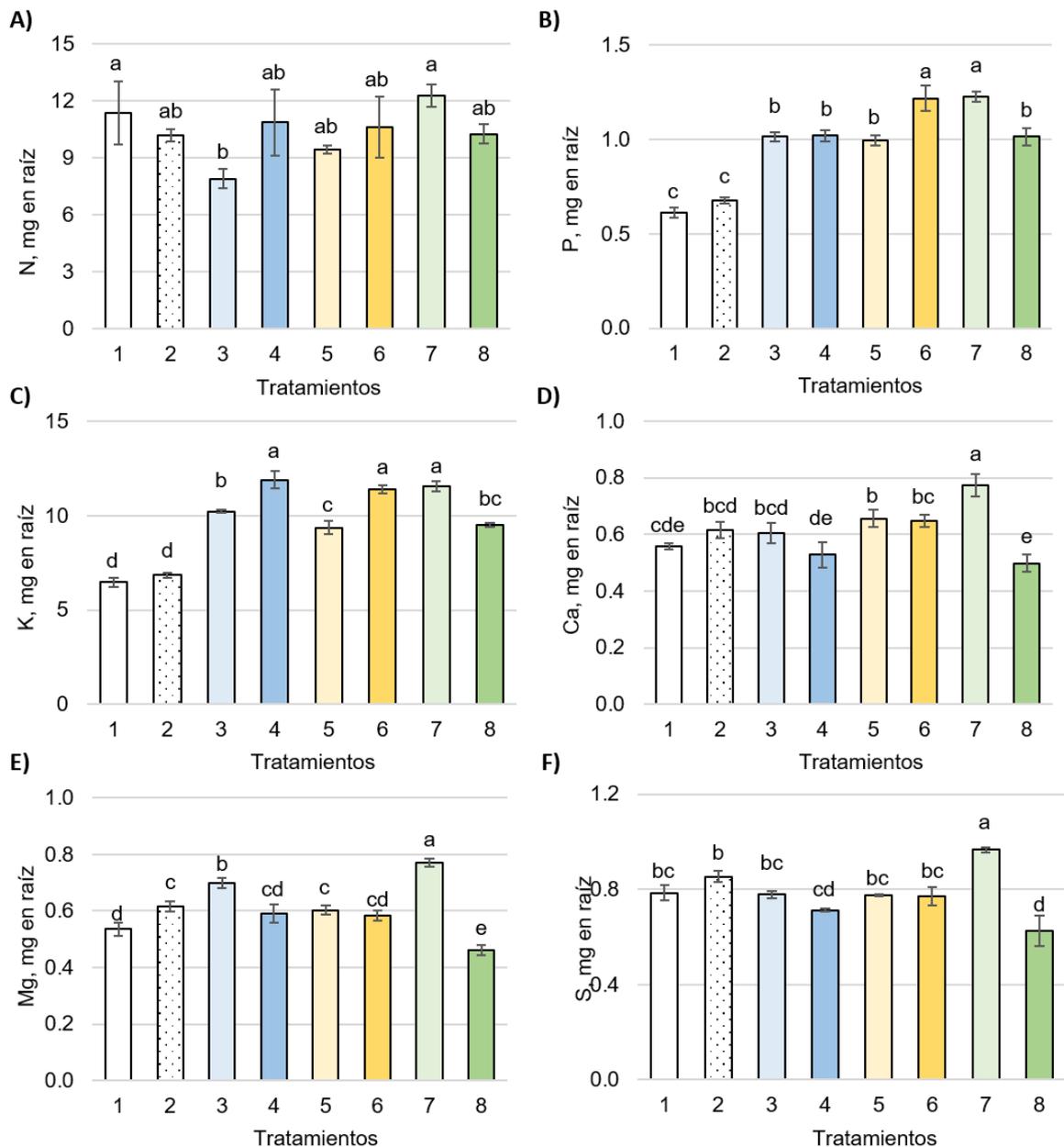


Figura 2.9. Acumulación de macronutrientos en raíces de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 14 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada figura son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=4$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de $[P]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de $[P]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de $[P]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de $[P]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de $[P]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de $[P]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

El patrón de acumulación de Ca, Mg y S en raíces fue similar entre tratamientos. Destaca el hecho de que en los tratamientos con nano-KH₂PO₄ al 50 y 100% de la concentración de P de la solución Yoshida con tripsina, se presentaron las acumulaciones más alta y baja respectivamente (**Figuras 2.9D, E y F**).

La absorción y transporte de las nanopartículas en las plantas son procesos de gran importancia para la exploración y aplicación de la nanotecnología en la agricultura. La absorción de nanopartículas por las plantas es un campo de muy reciente estudio ([Rico et al., 2011](#)). [Kurepa et al. \(2010\)](#) mencionan que existen varias posibles vías para la absorción de nanopartículas por las células vegetales. Los datos sugieren que las nanopartículas pueden entrar a la planta mediante la unión a proteínas transportadoras, a través de acuaporinas, canales iónicos, creación de nuevos poros (exclusivo en nanotubos de carbono, que crean o forman los poros para entrar a la célula) o mediante endocitosis.

Como se indicó previamente, desde una perspectiva que considera solo las concentraciones iniciales y finales de P en la solución ofertada a las plantas, es factible suponer una mayor eficiencia de absorción de P a partir de la fuente tradicional (**Figura 2.1**). Sin embargo, otra perspectiva que considera el tipo de transportadores de fosfato podría conducir a otra interpretación. En arroz, hasta el momento se han aislado 13 genes de la familia *Pht1*; de los cuales, ocho han sido caracterizados funcionalmente. Entre éstos se encuentran el *OsOT1*, *OsPT6*, *OsPT9* y *OsPT10* que son altamente expresados en raíces y por tanto son responsables de la absorción de P en arroz. El gen *OsOT1* se expresa de manera constitutiva en arroz; indicando que este gen tiene una función

importante en la absorción de fosfato bajo condiciones variadas de concentración de P. En contraste al gen *OsOT1*, los genes *OsPT6*, *OsPT9* y *OsPT10* son expresados de manera considerable bajo deficiencia de P y por tanto funcionan bajo condiciones bajas o deficientes de este elemento (Ye *et al.*, 2015).

En el contexto anterior, en el tratamiento 8 (100% del P de la solución Yoshida a partir de nano-KH₂PO₄ con tripsina), se registró el menor peso de biomasa seca de raíz y por tanto menor crecimiento de ésta (**Figura 2.5**); ambos rasgos, asociados a la suficiencia de P (Péret *et al.*, 2011). Empero, en este tratamiento no se tiene la mayor acumulación de P ni en vástago (**Figura 2.7B**), ni en raíz (**Figura 2.9B**); sino en el tratamiento 6 (100% del P de la solución Yoshida a partir de nano-KH₂PO₄). En este punto cabría la posibilidad de considerar que la alta disponibilidad inicial de P, propiciada con la adición de enzima tripsina en el tratamiento 8 (ver **Figura 1.9** del **Capítulo 1** de esta tesis; donde, después de 5 min de la adición de la tripsina, la concentración de P disponible se incrementa tres veces); inhibiera la expresión de los genes que codifican para los transportadores de alta afinidad, y solo funcionara el transportador constitutivo *OsOT1*. Por el contrario, en el tratamiento 6 donde la liberación de P no es inmediata, se indujo una absorción más eficiente de P vía transportadores de alta afinidad, lo que finalmente condujo a una mayor eficiencia fisiológica tanto del vástago como de la raíz en el tratamiento 6. Asimismo, se presume la expresión de genes de transportadores de alta afinidad en raíces (*OsPT6*, *OsPT9* y *OsPT10*) en ausencia y bajo suministro de P que explican los resultados obtenidos en altura de planta (**Figura 2.2**) y en biomásas de vástago, raíces y

total (**Figura 2.5** y **Cuadro 2.2**). En un estudio comparativo de siete genotipos de arroz, [Jeong et al. \(2015\)](#) reportaron una alta expresión del gen *OsPT6* en la variedad IR66 bajo deficiencia de P, y esta variedad también mostró un fuerte incremento en el crecimiento de la raíz inducida por la deficiencia de P, lo cual es coincidente con los resultados aquí observados.

Uno de los grandes retos que es necesario resolver es el hecho de que aún no están bien definidos los protocolos para la cuantificación de nanopartículas dentro de los tejidos, en tanto que los procesos de absorción, translocación, y acumulación de nanopartículas dependen de la especie de la planta y el tamaño, tipo, composición química, funcionalización, y la estabilidad de las nanopartículas ([Rico et al., 2011](#)).

En plantas de calabaza (*Cucurbita maxima*), las nanopartículas de Fe_3O_4 son absorbidas por las raíces y traslocadas a través de los tejidos de la planta. El 45.5% de las nanopartículas absorbidas se acumuló en las raíces y de 0.6% de las nanopartículas se detectaron en las hojas. Por el contrario, en frijol lima (*Phaseolus limensis*), no se observó absorción ni transporte de estas mismas nanopartículas, lo cual pone de manifiesto que los resultados observados pueden estar muy influenciados por el genotipo de la planta en evaluación ([Zhu et al., 2008](#)).

2.3.10. Variables relacionadas con fotosíntesis

Los menores valores de fijación de CO_2 se registraron en plantas de los tratamientos 1, 2 y 3 (agua destilada, polímero y 50% del P de la solución

Yoshida a partir de KH_2PO_4 , respectivamente), con valores de 3.4858, 3.1664 y 3.8993 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Por el contrario, los mayores valores de tasa fotosintética presentaron en plantas en los tratamientos 5 y 6 (50 y 100% de la concentración de P de la solución Yoshida suministrada a partir de nano- KH_2PO_4), con valores medios de 7.1149 y 7.2434 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (**Figura 2.10**); lo cual representa más del doble, la tasa fotosintética registrada en los tratamientos testigo y en el tratamiento con la dosis baja de P (50% del P de la solución Yoshida) a partir de la fuente convencional.

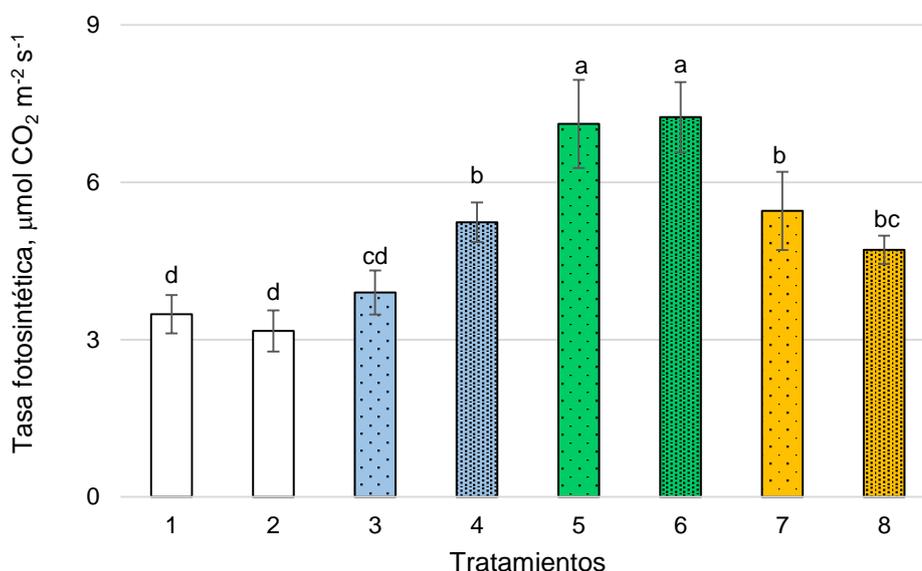


Figura 2.10. Tasa fotosintética de plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=9$).

Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

La productividad de la planta se basa en la fotosíntesis y esta depende de compuestos que contienen P; por tanto, un uso eficiente de P en la fotosíntesis es un factor potencialmente importante (Veneklaas *et al.*, 2012). El P es un componente estructural de biomoléculas vitales, incluidos los ácidos nucleicos, moléculas fuentes de energía (ATP, ADP, PPi), fosfolípidos y ácido fítico; asimismo, participa en la actividad fotosintética (Alcántar *et al.*, 2016). La concentración de P total en plantas superiores desarrolladas en condiciones de alto abastecimiento de P es superior a 5 g kg⁻¹ de materia seca; mientras que bajo condiciones óptimas de P, la mayoría de los cultivos presenta concentraciones de P menores a 4 g kg⁻¹ de materia seca (Veneklaas *et al.*, 2012). En arroz, el valor crítico inferior para P es de 3 g kg⁻¹ de materia seca (Ravi *et al.*, 2013).

Al asociar los resultados de tasa fotosintética (**Figura 2.10**) con los obtenidos en la concentración de P en vástago (**Figura 2.6B**), se observa una relación directa entre ambos. En los tratamientos testigo (1 y 2, sin P) se tuvieron concentraciones de P inferiores a 2 g kg⁻¹ de materia seca; asimismo en éstos se observa la menor fijación de C. En los tratamientos con oferta de P (3 a 8), las concentraciones de este elemento en vástagos fueron superiores a los 3 g kg⁻¹ de materia seca, valor crítico inferior para arroz, en consecuencia se incrementó en éstos la tasa fotosintética (**Figura 2.10**). Adicionalmente, la mayor fijación de C se registró en plantas del tratamiento 6, donde también se tuvo la mayor acumulación de P tanto en vástago (**Figura 2.7B**) como en raíz (**Figura 2.9B**).

Los resultados obtenidos de la tasa fotosintética de plantas tratadas con nano-KH₂PO₄ en ambas concentraciones de P de la solución Yoshida, mostraron un uso más eficiente del P en fotosíntesis. En particular la eficiencia fotosintética en el uso del P define la relación existente entre la tasa fotosintética y la concentración foliar de P (Veneklaas *et al.*, 2012).

Los valores de conductancia estomática, concentración intercelular de CO₂ y transpiración (**Figuras 2.11A a 2.11C**) guardan una relación inversa con la tasa fotosintética (**Figura 2.10**).

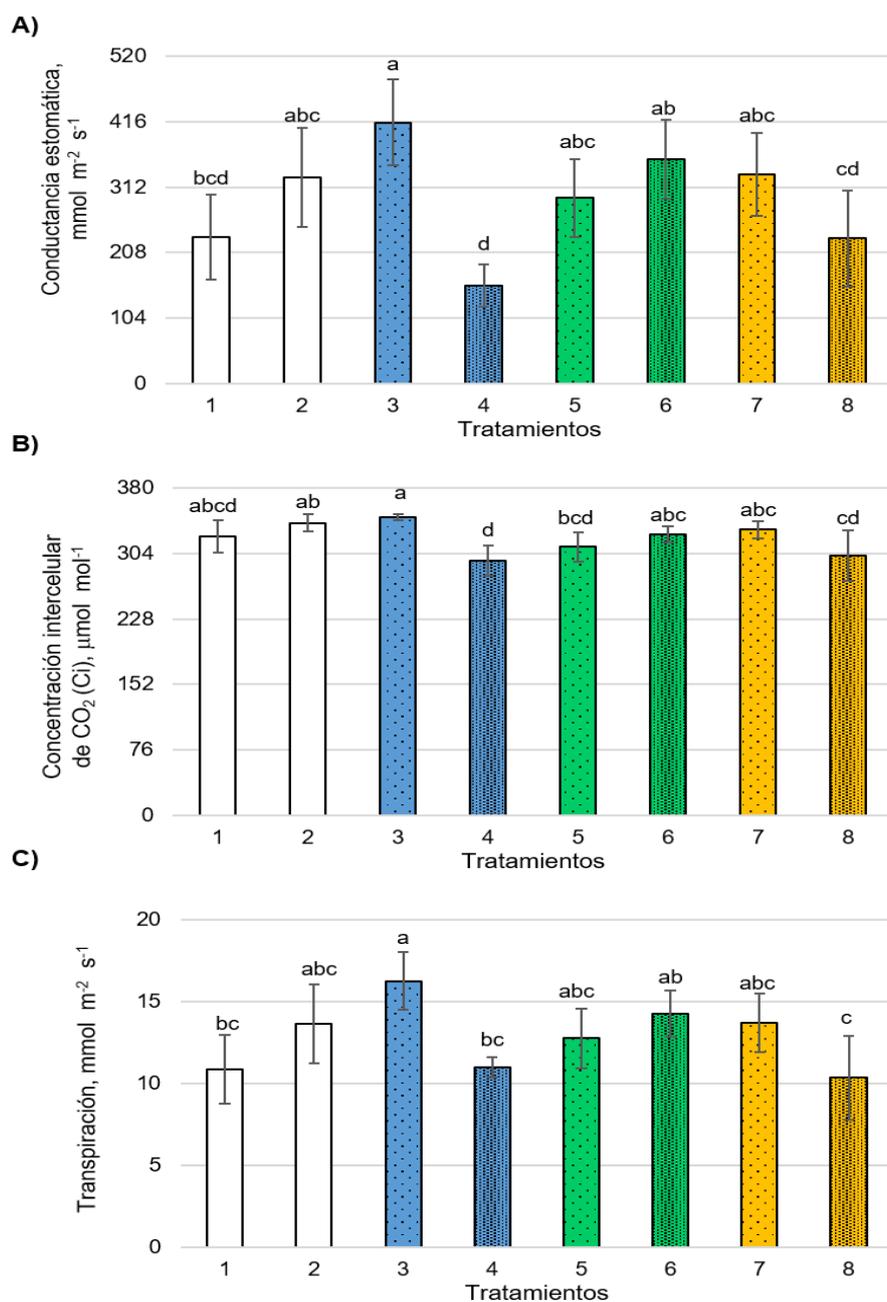


Figura 2.11. Conductancia estomática, concentración intercelular de CO_2 (Ci) y transpiración en plantas de arroz cultivar Morelos A-2010, tratadas durante 13 días con diferentes fuentes y concentraciones de P.

Medias \pm DE con letra distinta en cada subfigura son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$; $n=9$). Tratamientos: 1=Agua destilada; 2=Gelatina tipo A; 3=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 4=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de KH_2PO_4 ; 5=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 6=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 ; 7=50% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.1 mg L^{-1}); 8=100% de $[\text{P}]_{\text{solución Yoshida}}$ a partir de nano- KH_2PO_4 con tripsina (0.2 mg L^{-1}).

Las diferencias estadísticas presentadas en conductancia estomática, concentración intercelular de CO₂ y transpiración, no se relacionan con el estatus de P en vástagos. Algunos estudios han sugerido que bajo deficiencia de P, las plantas tienen una baja tasa fotosintética debido a la reducida conductancia estomática y a las concentraciones bajas de CO₂ en la cavidad subestomática (Warren, 2011). En particular en dos genotipos de arroz (Zhenongda 454, genotipo tolerante a deficiencia de P; y Sanyang'ai, genotipo sensible a la deficiencia de P), la deficiencia de P disminuyó la conductancia estomática, pero no tuvo influencia en la concentración interna de CO₂, lo que sugiere que la reducción en la tasa fotosintética observada en las plantas deficientes en P no son debidas a la limitación estomática (Li *et al.*, 2006). En otro estudio reciente donde evaluaron el efecto de bajas concentraciones de P en parámetros fotosintéticos de plantas de cuatro variedades de arroz (Akhanphou, MTU1010, RP BIO 226 y Swarna), encontraron que tanto en la fase de macollamiento como reproductiva, esta condición redujo la tasa fotosintética, la conductancia estomática, la tasa transpiratoria y la concentración interna de CO₂ en todas las variedades (Veronica *et al.*, 2017). En las condiciones experimentales del presente estudio, por el contrario, la ausencia de P o su nivel bajo, no afectaron de manera importante la conductancia estomática, concentración intercelular de CO₂ y transpiración (**Figura 2.11**).

Por otra parte, la relación entre la tasa fotosintética y la tasa de transpiración es un indicador usado para caracterizar la eficiencia instantánea del uso del agua (IWUE, por sus siglas en inglés) (Guo *et al.*, 2016). Al considerar este indicador, las plantas de los tratamientos con suministro de nano-KH₂PO₄ tanto a 50 como

a 100% del P de la solución Yoshida, tendrían mayor eficiencia instantánea del uso del agua en comparación con aquellas plantas tratadas con fertilización fosforada convencional y con nano-KH₂PO₄ con tripsina.

2.4. CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que en arroz Morelos A-2010 existe una absorción diferencial de P en función de la fuente de éste. El P suministrado a partir de KH₂PO₄ tiene una tasa de absorción más alta que el P ofertado a partir de nano-KH₂PO₄, solo o con tripsina. Sin embargo, la oferta de P como nano-KH₂PO₄ promueve una mayor eficiencia fisiológica del vástago y la raíz para P, lo que se traduce en su mayor acumulación en estos órganos. La concentración de P en vástago de P, así como su acumulación en vástago y raíces se relaciona positivamente con la tasa fotosintética. Asimismo, el tratamiento con nano-KH₂PO₄ incrementa en las plantas de arroz, la eficiencia instantánea del uso del agua.

2.5. LITERATURA CITADA

- Alcántar-González G, Trejo-Téllez L, Fernández-Pavía YL, Rodríguez-Mendoza MN. 2016. Capítulo 2. Elementos esenciales. *In: Nutrición de Cultivos*. Segunda edición. Alcántar-González G, Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC (eds.). Ed. Fundación Colegio de Postgraduados. México. pp. 22-55
- Assuero SG, Mollier A, Pellerin S. 2004. The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant Cell and Environment* 27(7): 887-895. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01194.x

- Chaudhary RC, Nanda JS. 2003. Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAO. Roma, Italia. Disponible en línea en: <http://www.fao.org/docrep/006/y2778s/y2778s04.htm>. Consultado: febrero 18, 2017.
- Chiera J, Thomas J, Rufty T. 2002. Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *Journal of Experimental Botany* 53(368): 473-481. Doi: 10.1093/jexbot/53.368.473
- Cifuentes Z, Custardoy L, de la Fuente JM, Marquina C, Ibarra MR, Rubiales D, Pérez-de-Luque A. 2010. Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants. *Journal of Nanobiotechnology* 8(1): 26. Doi: 10.1186/1477-3155-8-26
- Dobermann A, Fairhurst TH. 2000. Nutrient disorders and nutrient management. Potash and Phosphate Institute, Potash and Phosphate Institute of Canada and International Rice Research Institute, Singapore.
- Fageria NK, Oliveira JP. 2014. Nitrogen, Phosphorus and Potassium Interactions in Upland Rice, *Journal of Plant Nutrition* 37(10): 1586-1600. Doi: 10.1080/01904167.2014.920362
- Gemenet DC, Hash CT, Sanogo MD, Sy O, Zangre RG, Leiser WL, Haussmann BIG. 2015. Phosphorus uptake and utilization efficiency in West African pearl millet inbred lines. *Field Crops Research* 171(2015): 54-66. Doi: 10.1016/j.fcr.2014.11.001
- González MP, Fernández PR, Coronado MJ, Corredor E, Testillano PS, Risueño MC, Pérez de Luque A. 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany* 101(1): 187-195. Doi: 10.1093/aob/mcm283
- Guo R, Sun S, Liu B. Difference in leaf water use efficiency/photosynthetic nitrogen use efficiency of Bt-cotton and its conventional peer. *Scientific Reports* 6: 33539. Doi: 10.1038/srep33539

- Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N. 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* 11(12): 610-617. Doi: 10.1016/j.tplants.2006.10.007
- Jeong K, Mattes N, Catausan S, Chin JH, Paszkowski U, Heuer S. 2015. Genetic diversity for mycorrhizal symbiosis and phosphate transporters in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 57: 969-979. Doi: 10.1111/jipb.12435
- Kavanová M, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Schnyder H. 2006. Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. *Plant Physiology* 141(2): 766-775. Doi: 10.1104/pp.106.079699
- Kurepa J, Paunesku T, Vogt S, Arora H, Rabatic BM, Lu J, Smalle JA. 2010. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Letters* 10(7): 2296-2302. Doi: 10.1021/nl903518f
- Li J, Xie Y, Dai A, Liu L, Li Z. 2009. Root and shoot traits responses to phosphorus deficiency and QTL analysis at seedling stage using introgression line of rice. *Journal of Genetics and Genomics* 36(3): 173-183. Doi: 10.1016/S1673-8527(08)60104-6
- Li Y-f, Luo An-c, Hassan MJ, Wei X-h. 2006. Effect of phosphorus deficiency on leaf photosynthesis and carbohydrates partitioning in two rice genotypes with contrasting low phosphorus susceptibility. *Rice Science* 13(4): 283-290.
- Liu R, Lal R. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports* 4: 5686-5691. Doi: 10.1038/srep05686
- López-Moreno ML, de la Rosa G, Hernández-Viezcas JA, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. 2010. X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO₂ nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3689-3693. Doi: 10.1021/jf904472e

- Luquet D, Zhang BG, Dingkuhn M, Dexet A, Clément-Vidal A. 2005. Phenotypic plasticity of rice seedlings: Case of phosphorus deficiency. *Plant Production Science* 8(2): 145-151. Doi: 10.1626/pps.8.145
- Ma C, White JC, Dhankher OP, Xing B. 2015. Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environmental Science and Technology* 49(12): 7109-7122. Doi: 10.1021/acs.est.5b00685
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays whit tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179(3): 154-163. Doi: 10.1007/s12571-012-0168-1
- Péret B, Clément M, Nussaume L, Desnos T. 2011. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* 16(8): 442-450. Doi: 10.1016/j.tplants.2011.05.006
- Ravi P, Raj B, Rao PC. 2013. Nutrient status and establishment of critical values and adequate ranges for different nutrients for rice (*Oryza sativa* L.) trough DRIS in Karimnagar District of Andhra Pradesh. *International Journal of Developmental Research* 3(10): 102-105.
- Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(8): 3485-3498. Doi: 10.1021/jf104517j
- Rouached H. 2011. Multilevel coordination of phosphate and sulfate homeostasis in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(7): 952-955. Doi: 10.4161/psb.6.7.15318
- Rouached H, Secco D, Arpat B, Poirier Y. 2011. The transcription factor PHR1 plays a key role in the regulation of sulfate shoot-to-root flux upon phosphate starvation in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 11(1): 19.

- Salcedo-Aceves J, Barrios-Gómez EJ. 2012. Morelos A-2010, new rice variety for direct sowing for central Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(7): 1453-1458.
- Santos dMG, Ribeiro VR, Oliverira dFR, Pimentel C. 2004. Gas Exchange and yield response to foliar phosphorus application in *Phaseolus vulgaris* L. under drought. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16(3):171-179. Doi: 10.1590/S1677-04202004000300007
- SAS. 2016. SAS User's Guide. SAS Institute Inc. Version 9.4. USA. Cary, NJ, USA.
- Seck PA, Diagne A, Mohanty S, Wopereis MC. 2012. Crops that feed the world 7: Rice. *Food Security* 4(1): 7-24. Doi: 10.1007/s12571-012-0168-1
- Tolentino-Martínez JM. 2014. La producción de arroz del estado de Morelos: una aproximación desde el enfoque SIAL. *Estudios Sociales* 22(44): 39-61.
- Veneklaas EJ, Lambers H, Bragg J, Finnegan PM, Lovelock CE, Plaxton WC, Price CA, Scheible W-R, Shane MW, White PJ, Raven JA. 2012. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytologist* 195: 306-320. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04190.x
- Veronica N, Subrahmanyam D, Kiran TV, Yugandhar P, Bhadana VP, Padma V, Jayasree G, Voleti SR. 2017. Influence of low phosphorus concentration on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant response of rice genotypes. *Photosynthetica* 55(2): 285-293. Doi: 10.1007/s11099-016-0640-4
- Wang Z, Xie X, Zhao J, Liu X, Feng W, White JC, Xing B. 2012. Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental Science and Technology* 46 (8): 4434-4441. Doi: 10.1021/es204212z
- Warren RC. 2011. How does P affect photosynthesis and metabolite profiles of *Eucalyptus globulus*? *Tree Physiology* 31: 727-739. Doi: 10.1093/treephys/tpr064

- Wu P, Shou H, Xu G, Lian X. 2013. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology* 16(2): 205-212. Doi: 10.1016/j.pbi.2013.03.002
- Yan W, Chen GH, Yang LF, Gai JY, Zhu YL. 2014. Overexpression of the rice phosphate transporter gene *OsPT6* enhances tolerance to low phosphorus stress in vegetable soybean. *Scientia Horticulturae* 177: 71-76. Doi: 10.1016/j.scienta.2014.07.037
- Ye Y, Yuan J, Chang X, Yang M, Zhang L, Lu K, Lian X. 2015. The phosphate transporter gene *OsPht1;4* is involved in phosphate homeostasis in rice. *PLoS One* 10(5): e0126186. Doi: 10.1371/journal.pone.0126186
- Yoshida, S., Forno, D. A., Cook, J. H. and Gomez, K. A. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. *In: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. IRRI. Los Banos, Philippines. pp. 61-66.
- Zhu H, Han J, Xiao JQ, Jin Y. 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring* 10: 713-717. Doi: 10.1039/b805998